UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de medios de cultivo y fitohormonas para la inducción de callogénesis a partir de dos explantes de arándano (*Vaccinium Corymbosum l.)* cv. Biloxi.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingenieros Biotecnólogos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autores: Dayanna Mishel Changoluisa Arguero

Oscar David Peralta Lluglla

Tutor: Dra. Helena Maritza De la Torre Olvera

Ambato – Ecuador

Agosto 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Helena Maritza De la Torre Olvera

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 01 de junio del 2024



_____

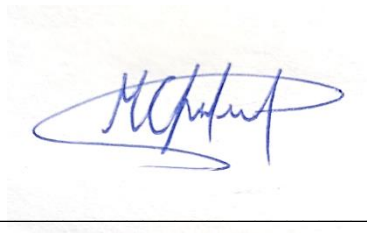
Dra. Helena Maritza De la Torre Olvera

CI. 1309651998

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

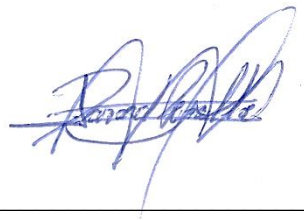
Nosotros, Dayanna Mishel Changoluisa Arguero y Oscar David Peralta Lluglla, manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieros Biotecnólogos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Dayanna Mishel Changoluisa Arguero

1752253441

AUTOR



Oscar David Peralta Lluglla

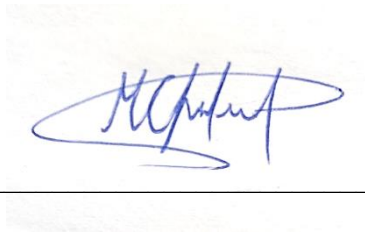
1804346391

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

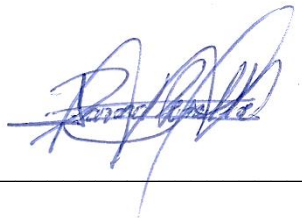
Cedemos los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando nuestros derechos de autor.



Dayanna Mishel Changoluisa Arguero

1752253441

AUTOR



Oscar David Peralta Llugllla

1804346391

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
MARIO DANIEL GARCIA SOLIS

Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
MARIA DANIELA GARCES MONCAYO

Mg. Garces Moncayo María Daniela

1803571585

Firmado electrónicamente por:
LANDER VINICIO PEREZ ALDAS

Mg. Pérez Aldas Lander Vinicio

1802706596

Ambato, 2 de agosto del 2024

DEDICATORIA

A todos aquellos que creyeron en nosotros.

A nosotros.

AGRACEDIMIENTOS

En primer lugar, agradecemos a Dios, a nuestras familias y amigos, este momento no sería posible de no ser por todos ustedes.

A nuestra tutora, PhD. Helena de la Torre, por acogernos en esos momentos de incertidumbre. Y a la Ing. Ruth Pérez por brindarnos su sabiduría.

A nosotros.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR....ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.... iii
DERECHOS DE AUTOR....iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO v
DEDICATORIA....vi
AGRACEDIMIENTOS vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.... viii
RESUMEN EJECUTIVO....xiv
ABSTRACT....xv
CAPÍTULO I 1
MARCO TEÓRICO....1
1.1. Antecedentes investigativos....1
1.1.1. Justificación 1
1.1.2. Arándano, origen y producción....1
1.1.3. Arándano en Ecuador....3
1.1.4. Descripción taxonómica y botánica del arándano 4
1.1.4.1. Hojas 5
1.1.4.2. Flores....5
1.1.4.3. Fruto....5
1.1.4.4. Raíz 5
1.1.5. Ciclo de crecimiento 5
1.1.5.1. Dormancia invernal....6
1.1.5.2. Brotación....6
1.1.5.3. Floración 6
1.1.5.4. Desarrollo del fruto 7
1.1.6. Métodos de propagación 7

1.1.6.1. Propagación por esquejes 8
1.1.6.2. Propagación *in vitro* o micropropagación 8
1.1.7. Factores que afectan en la inducción de callos 9
1.1.7.1. Explantes 10
1.1.7.2. Medios 10
1.1.7.3. Fitohormonas 10
1.1.7.3.1. Coadyubantes 11
1.2. Objetivos 12
1.2.1. Objetivo general 12
1.2.2. Objetivos específicos 12
2. CAPÍTULO II 13
METODOLOGÍA 13
2.1. Materiales 13
2.2. Métodos 14
2.2.1. Definir la eficiencia de los medios de cultivo enriquecidos con agua de coco y carbón activado en la inducción de callos. 14
2.2.1.1. Recolección y selección del material vegetal 14
2.2.1.2. Desinfección del material vegetal 15
2.2.1.2.1. Desinfección de hojas 15
2.2.1.2.2. Desinfección de flores 15
2.2.1.3. Preparación de medios 16
2.2.1.4. Inducción de callos 16
2.2.1.4.1. Inducción de callos en hojas 16
2.2.1.4.2. Inducción de callos en flores 17
2.2.1.5. Incubación de material vegetal 17
2.2.1.6. Variables evaluadas en la inducción de callos 18
2.2.2. Determinar la mejor dosis de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y Kinetina para la inducción de callos *in vitro* en arándano. 18

2.2.2.1. Diseño experimental 18
2.2.2.2. Preparación de medios de cultivo 19
2.2.2.3. Selección, desinfección e inducción del material vegetal 20
2.2.2.4. Análisis de datos 20
2.2.3. Determinación el porcentaje de callos potencialmente embriogénicos 20
2.2.4. Subcultivos 21
3. CAPÍTULO III 22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 22
3.1. Análisis y discusión de los resultados. 22
3.1.1. Eficiencia de los medios de cultivo 22
3.1.2. Dosificación de fitohormonas en medios de cultivo 27
3.1.3. Porcentaje de callos embriogénicos 30
3.1.4. Subcultivos 31
3.2. Verificación de la hipótesis 32
4. CAPÍTULO IV 34
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 34
4.1. Conclusiones 34
4.2. Recomendaciones 35
5. CAPITULO V 36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 36
ANEXOS 44

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. *Taxonomía de la especie* Vaccinium corymbosum..... 4

Tabla 2. Recursos materiales que se utilizaron. 13

Tabla 3. *Descripción de los tratamientos*..... 16

Tabla 4. Variables evaluadas 18

Tabla 5. Tratamientos para inducción de callos: 3 tipos de medios de cultivo e interacción hormonal 19

Tabla 6. Observaciones semanales de medios para subcultivo 32

Tabla 7. Análisis de varianza MEDIO x HOMONA x EXPLANTE 33

Tabla 8. Descripción de los macronutrientes, micronutrientes y componentes orgánicos para un litro (L) del medio WPM 46

Tabla 9. ANOVA para % Inducción por Medios en hojas..... 47

Tabla 10. Prueba post hoc 48

Tabla 11. ANOVA para % Inducción por Medios en flores 48

Tabla 12. Prueba post hoc 49

Tabla 13. ANOVA para % Inducción por Medios en hojas..... 49

Tabla 15. ANOVA para % Inducción por Medios en flores 50

Tabla 16. Prueba post hoc 51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de arándano por país. 3

Figura 2. Estados del desarrollo de la yema floral y flor. 7

Figura 3. Estados del desarrollo del fruto. 7

Figura 4. Proceso en la propagación por esquejes. 8

Figura 5. Vías de regeneración vegetal. 9

Figura 6. Ubicación del lugar donde se obtuvo el material vegetal. 15

Figura 7. Etapas de la desinfección del material vegetal. 16

Figura 8. Inducción de callos 17

Figura 9. Tinción de callos embriogénicos 21

Figura 10. Subcultivo de callos embriogénicos 21

Figura 11. Explantes de hoja oxidados. 22

Figura 12. Porcentaje de inducción de callos en hojas. 23

Figura 13. Porcentaje de inducción de callos en flores 24

Figura 14. Consistencia y color de los callos obtenidos por flores. 25

Figura 15. Consistencia y color de los callos obtenidos por hojas. 26

Figura 17. Porcentaje de inducción en flores 28

Figura 18. Porcentaje de inducción en hojas 29

Figura 19. Corte histológico de callo 31

Figura 20. Preparación de medios de cultivo 44

Figura 21. Recolección del material vegetal 44

Figura 22. Desinfección del material vegetal: 44

Figura 23. Extracción de las hojas *in vitro* 45

Figura 24. Siembra del material vegetal 45

Figura 25. Callos obtenidos en dos tipos de explantes 45

Figura 26. Pesaje de los callos obtenidos 46

Figura 27. Tinción 46

Figura 28. Subcultivo de callos.....46

Figura 29. Color de los callos obtenidos por flores 52

Figura 30. Consistencia de los callos obtenidos por flores.....52

Figura 31. Color de los callos obtenidos por hojas.....53

Figura 32. Consistencia de los callos obtenidos por hojas 53

RESUMEN EJECUTIVO

El consumo de arándano ha incrementado su demanda a nivel internacional y nacional, son necesarias plantas sanas de manera eficiente, por lo mismo, esta investigación busca evaluar medios de cultivo y fitohormonas para la inducción de callogénesis a partir de dos explantes de arándano (*Vaccinium corymbosum L*) cv. Biloxi. Se realizó la introducción de hojas y flores de arándano los cuales se sometieron a un proceso de desinfección. Además, se evaluó hojas provenientes de plantas establecidas en condiciones *in vitro*. Se utilizó como base Woody Plant Medium para formular un total de trece tratamientos, a los cuales se agregó enriquecedores y diferentes concentraciones de fitohormonas. Se evaluó el porcentaje de inducción de callos y porcentaje de callos embriogénicos, sus características morfológicas y su viabilidad. Los resultados demostraron que las hojas tomadas *ex vivo* no fueron viables para el desarrollo de callos. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a las dosis de 2,4D y KIN en el uso de flores. En hojas la dosis de 2 miligramos en litro de 2,4D ofreció callos con características ligeramente mejores y la concentración de 3 miligramos en litro de KIN igual mostro una ligera diferencia favorable. En conclusión, la composición del medio, interacción hormona, el tipo de explante y sus interacciones, tiene efecto significativo en la tasa de inducción de callos. Además, que el mejor explante para el desarrollo eficiente de callos son las flores, las cuales brindan características favorables para un proceso posterior de diferenciación completa de la planta de arándano.

Palabras clave: Biotecnología vegetal, desarrollo de callos, tipos de explantes, medios enriquecidos, *V. corumbosum L.*

ABSTRACT

Blueberry consumption has increased its demand at international and national level, healthy plants are necessary efficient, therefore, this research seeks to evaluate culture media and phytohormones for the induction of callogenesis from two blueberry explants (Vaccinium corymbosum L) cv. Biloxi. Blueberry leaves and flowers that had undergone a disinfection process were introduced. In addition, leaves from plants established under in vitro conditions were evaluated. Woody plant medium was used as a base to formulate a total of thirteen treatments to which enrichers and different concentrations of phytohormones were added. The percentage of callus induction and the percentage of embryogenic calli, their morphological characteristics and their viability were evaluated. The results showed that the leaves taken ex vivo were not viable for callus development. No significant differences were found in the doses of 2,4D and KIN used in flowers. In leaves, the dose of 2 milligrams per litre of 2,4D gave callus with slightly better characteristics and the concentration of 3 milligrams per litre of KIN also showed a slight favourable difference. In conclusion, the composition of the medium, the hormone interaction, the type of explant and their interactions have a significant effect on the rate of callus induction. Furthermore, the best explant for efficient callus development is the flower, which provides favourable characteristics for a subsequent process of complete differentiation of the blueberry plant.

Key words: Plant biotechnology, callus development, explant types, enriched media, *V. corumbosum L.*

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Justificación

El arándano es un cultivo de alto valor económico y comercial a nivel mundial. Su demanda está en constante crecimiento debido a sus beneficios para la salud y su uso en diversos productos alimenticios **(Kramer et al., 2023)**. En los últimos años la producción de arándanos en América Latina ha crecido de manera vertiginosa, la mayor parte del producto es destinado a mercados de exportación **(Weber, 2024)**. Varios países de la región como son Chile, Perú y Ecuador han demostrado un desarrollo continuo en cuanto al uso de técnicas de cultivo eficientes **(Huylenbroeck & Foucher, 2023).** El Ecuador cuenta con alrededor de seis mil productores de arándano en el centro del país, un número considerablemente bajo debido a que es necesaria la adquisición de plantas certificadas **(Agrocalidad, 2023)**. Es preciso que el material vegetal no presente fitopatologías junto con un desarrollo adecuado y alta productividad, esto para cumplir con estándares de calidad internacionales **(Menzel et al., 2021).**

Técnicas biotecnológicas como la micropropagación y mejoramiento genético son necesarias para suplir la demanda de material vegetal de calidad **(Yeh et al., 2023)**. La micropropagación como técnica de reproducción asexual presenta ventajas en el desarrollo de cultivos, permitiendo la rápida producción de un gran número de plántulas clonales **(Guo et al., 2019)**. La inducción de callos permite la propagación clonal de plantas con características deseables, como resistencia a enfermedades, tolerancia a condiciones adversas y mejora de la calidad de los frutos **(Debnath & Goyali, 2020).** Evaluar y optimizar los medios de cultivo para la inducción de callos puede acelerar estos procesos y mejorar la eficiencia de la propagación, mejorando la producción y la calidad de las plantas. Un factor clave en la viabilidad de la técnica es el uso adecuado de explantes, los cuales presentan características que favorecen la formación de callos **(Nhut et al., 2022)**.

1.1.2. Arándano, origen y producción

Los arándanos (*Vaccinium* spp.) pertenecen a la familia *Ericaceae* que contiene alrededor de 450 especies diferentes **(Manful et al., 2023)**. El arándano es un arbusto enano caducifolio que produce frutos comestibles de acuerdo con cada variedad **(Baenas et al., 2020)**. La mayoría de las especies habitan las laderas de las montañas de los trópicos y el resto se distribuye en las regiones subtropicales, templadas y boreales del hemisferio norte. Las plantas del género *Vaccinium* varían en forma, desde epífitas hasta enredaderas y árboles, siendo la mayoría arbustos terrestres **(Hancock et al., 2003)**.

Las especies de arándanos cultivadas más comunes son: arándano de arbusto bajo (*V. angustifolium*) que se cultiva en América del Norte, arándano de arbusto alto (*V. corymbosum*) que se cultiva principalmente en zonas altas con climas templados y arándano ojo de conejo (*V. ashei*) común en el sur de Estados Unidos **(Hillman, 2013)**. La especie de mayor importancia económica es *Vaccinium corymbosum* debido a que es cultivado en un amplio rango de climas. Sin embargo, los lugares de cultivo deben cumplir los requerimientos de frio y un invierno adecuado a la variedad **(Bañados et al., 2007).**

Durante el periodo de COVID del 2020, la demanda mundial de arándano aumento considerablemente debido a que es un producto con alto valor nutricional y puede ser almacenado en congelación **(IBO, 2023)**. La demanda post COVID se ha visto sustituida por producto en fresco, dando lugar a nuevas plantaciones en regiones productoras como Perú, México y el noroeste del Pacífico **(Soto-Caro et al., 2023)**. Existe además una inmensa producción proveniente de Asia, donde para el 2022 se produjeron 268.78 toneladas métricas de producto fresco **(IBO, 2023)**.

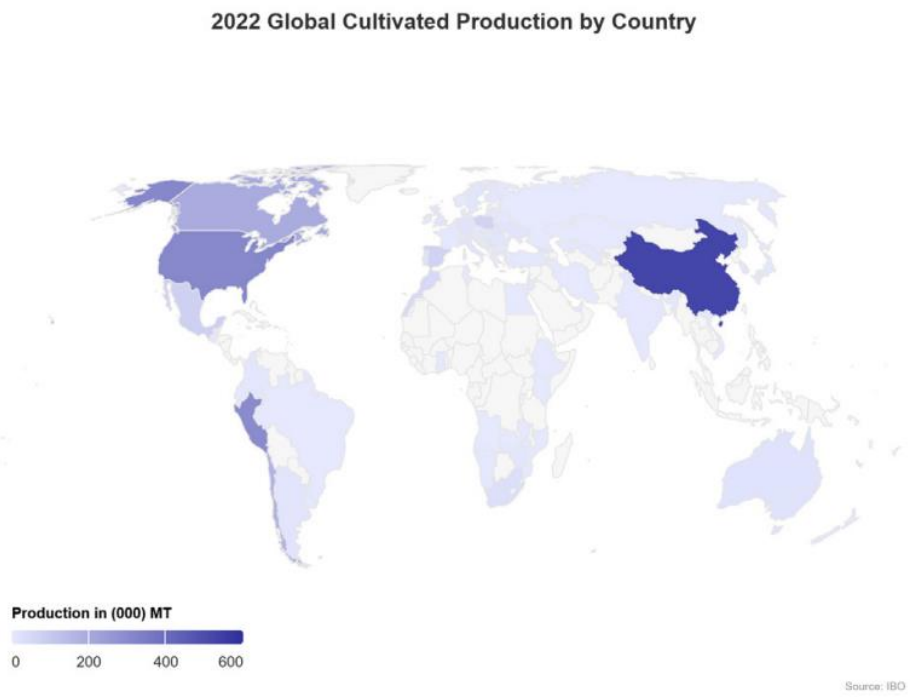


Figura 1. Producción mundial de arándano por país.

Nota: La imagen muestra la distribución mundial de arándano, la intensidad del color azul representa las toneladas métricas en peso seco que producen. Adaptado de **IBO (2023)**.

1.1.3. Arándano en Ecuador

El Ecuador empezó con la producción de arándano alrededor del 2015, actualmente cuenta con plantaciones de producción ubicadas en toda su cordillera de los Andes y plantaciones experimentales en la Costa como es Santa Elena, Manabí y el Oro **(Agrocalidad, 2022)**. El 95% de las plantaciones se centra en los Andes donde empresas nacionales e internacionales realizan ensayos y pruebas de diferentes variedades con el objetivo de exportar su producción, la mayor parte de la producción es de consumo nacional, pero existen exportaciones pequeñas a España y Panamá que se han realizados desde el 2021 **(IBO, 2023)**.

La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, desde el cantón Zapotillo en el 2022 realizó una inspección fitosanitaria, supervisando también la implementación del tratamiento de frío para 12.096 kg de arándanos que se enviaron a Estados Unidos **(IBO, 2023)**. Esta inspección certifico que el producto satisface los requisitos demandados por este significativo

mercado internacional, por lo cual estos arándanos, que se cultivan en 10 provincias de Ecuador pueden ser exportados a 40 diferentes destinos alrededor del mundo **(Agrocalidad, 2022)**. La capacitación de los agricultores y el conocimiento sobre nuevas técnicas de cultivo involucradas con la biotecnología, son aspectos importantes a tomar en cuenta si se quiere explotar en el Ecuador **(Cadena, 2022)**.

1.1.4. Descripción taxonómica y botánica del arándano

El arándano taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera:

Tabla 1.

Taxonomía de la especie Vaccinium corymbosum

Reino	*Plantae*
Clase	*Magnoliopsida*
Subclase	*Dilleniidae*
Orden	*Ericales*
Familia	*Ericaceae*
Subfamilia	*Vaccinioideae*
Genero	*Vaccinium*
Especie	*V. corymbosum*
Nombre común	Arándano alto, Arándano de arbusto alto

Nota: Información obtenida de **Gordó (2011)**.

El arándano de arbusto alto (*Vaccinium corymbosum*), conocido en inglés como "highbush blueberry", es un arbusto perenne de madera leñosa que llega a medir 1,5 a 4 metros en su madurez **(Undurraga & Vargas, 2013)**. A continuación, se presenta una descripción botánica detallada de esta especie.

1.1.4.1. Hojas

Las hojas se distribuyen a lo largo de los tallos de forma simple y alterna. Tienen forma ovalada y miden entre 3 a 8 cm de largo y 1 a 3 cm de ancho. Son de color verde oscuro en el haz y más claras en el envés **(Leguízamo, 2021)**.

1.1.4.2. Flores

Las flores se presentan en racimos de entre 6 a 10 flores aproximadamente por yema. Tienen forma de campana, con tamaño de entre 5 a 10 mm y de color rosa pálido o blanco **(Giacalone et al., 2015)**. La corola de la flor es esférica y de color verde, que poseen entre 4 a 5 pétalos y de 8 a 10 estambres. Los ovarios inferiores están compuestos por lóculos y dentro de cada lóculo de encuentran los óvulos **(Baldomero et al., 2017)**.

1.1.4.3. Fruto

El fruto es una baya casi esférica con un característico color azul que mide entre 7 a 15 mm de diámetro **(Hancock et al., 2003)**. Los frutos de los arándanos son el principal atractivo, no solo por su sabor dulce con ligera acidez, sino también por su alto contenido de antioxidantes y nutrientes beneficiosos para la salud **(Leguízamo, 2021)**.

1.1.4.4. Raíz

El sistema radical del arándano es superficial, fibroso, de poca extensión y se compone de finas raicillas, sin pelos radiculares ya que las raíces jóvenes se encargan de la absorción **(Akimova et al., 2022)**.

1.1.5. Ciclo de crecimiento

El arándano presenta un ciclo de crecimiento anual alternando períodos de dormancia y períodos de crecimiento. Los órganos como raíces, coronas y tallos son permanentes y están presentes durante todo el año, mientras que, brotes, hojas, flores y frutos se consideran transitorios al estar solo en la etapa de crecimiento **(Retamales & Hancock, 2018)**. Dentro de estos períodos se incluye: dormancia invernal, brotación, floración, desarrollo de frutos, maduración y preparación para el invierno.

1.1.5.1. Dormancia invernal

Durante el invierno con la disminución de temperatura, los arbustos entran en dormancia para protegerse del frio. En este periodo las plantas requieren de una acumulación de horas frio (alrededor 800 a 1200 horas) para prepararse para la brotación (Phillips et al., 2020).

1.1.5.2. Brotación

Ocurre entre 1 y 2 semanas antes de la floración, con el aumento de temperatura y la acumulación de suficientes horas de frio en el invierno. Las yemas vegetativas latentes y formadas en la temporada anterior se hinchan y dan lugar a la formación de nuevos brotes **(Pritts et al., 1992)**.

1.1.5.3. Floración

Las yemas florales crecen y se abren dando lugar a racimos, posteriormente, las flores se abren como se observa en la Figura 2, lo que ayuda a extender el periodo de polinización. **(Kuepper et al., 2004)**.



Figura 2. Estados del desarrollo de la yema floral y flor.

Nota: A. Yema floral cerrada**, B.** Yema floral hinchada**, C.** Quiebre de yema flora**, D.** Racimo apretado**, E.** Botón rosado temprano**, F.** Botón tardío, **G.** Inicio floración, **H.** Floración**, I.** Caída de pétalos. Adaptado de **Pinochet et al. (2014)**.

1.1.5.4. Desarrollo del fruto

La polinización exitosa es importante para el desarrollo del fruto, las flores fecundadas se transforman en pequeños frutos verdes, los cuales maduran cambiando su color de verde a rojo hasta llegar a azul oscuro como se observa en la Figura 3 **(Undurraga D. & Vargas S., 2013)**.



Figura 3.2 Estados del desarrollo del fruto.

Nota: Adaptado de **Pinochet et al. (2014**).

1.1.6. Métodos de propagación

La propagación del arándano (*V. corymbosum*) puede realizarse mediante métodos sexuales y asexuales. La propagación sexual se realiza mediante el uso de semillas. Este método no es utilizado para la producción comercial debido a que al combinarse el material genético de los progenitores se genera variabilidad genética, que puede originar plantas con características no deseadas **(Hicks, 2011)**. En contraste, la propagación asexual implica la reproducción de plantas mediante partes vegetativas de una planta madre con el fin de preservar las características genéticas deseadas **(Zhao et al., 2011)**. En el caso del arándano se propagan mediante esquejes y por micropropagación:

1.1.6.1. Propagación por esquejes

Se realiza a partir de segmentos nodales de madera blanda o semidura, tallos, nodos, partes de raíz o yemas de hojas de una planta madre para reproducir plantas clonales. El segmento cortado se planta en tierra dentro de una maceta, a este proceso se le puede complementar con hormonas de crecimiento. Una de sus desventajas es la poca capacidad de enraizamiento de las plantas clonales que limita el crecimiento **(An et al., 2018)**.



Figura 4.3 Proceso en la propagación por esquejes.

Nota: Adaptado de **Debnath & Goyali (2020)**

1.1.6.2. Propagación *in vitro* o micropropagación

La micropropagación se realiza en un ambiente aséptico y controlado utilizando células, tejidos u órganos de una planta como explante. El explante se cultiva en un medio de cultivo que pueda suministrar los nutrientes necesarios para el crecimiento de la planta **(Kharel et al., 2022)**. La regeneración de plantas mediante cultivo de tejidos se basa en la totipotencia, lo que permite a

las células diferenciarse, multiplicarse y convertirse en plantas maduras en condiciones de cultivo adecuadas. Esta capacidad permite garantizar un suministro rápido y continuo de plantas sanas, genéticamente idénticas y libres de patógenos durante todo el año (Ghosh et al., 2018).

Existen dos vías para la regeneración de una planta, por organogénesis directa e indirecta. La organogénesis directa, se forman nuevos órganos, en general brotes (Figura 5A) mediante de células meristemáticas no especializadas como yemas apicales o axilares **(Debnath, 2007)**. Mientras, en la organogénesis indirecta se da una desdiferenciación de tejidos especializados como hojas para desarrollar masas de células no diferenciadas llamada callo (Figura 5B), que pueden formar órganos o embriones somáticos en las condiciones adecuadas **(von Arnold et al., 2002)**.

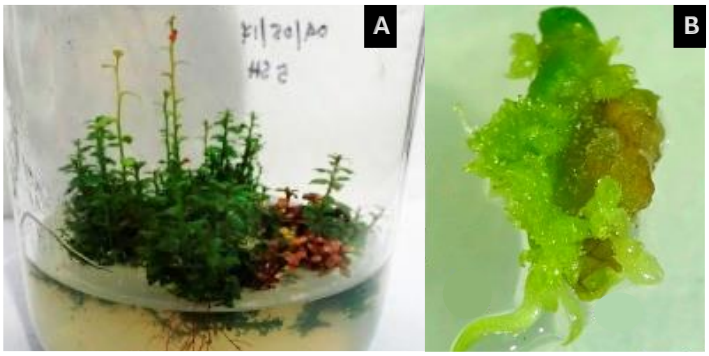


Figura 5. Vías de regeneración vegetal.

Nota: A Obtención de brotes**. B.** Obtención de callo. Adaptado de **Ghosh et al. (2018)**.

1.1.7. Factores que afectan en la inducción de callos

Los órganos de las plantas pueden ser introducidos y cultivados en un entorno *in vitro,* tienen la capacidad de generar nuevos brotes o raíces adventicias bajo ciertas condiciones **(Long et al., 2022)**. La regeneración de estos órganos puede verse afectada por una variedad de factores externos, como la aplicación de reguladores de crecimiento de plantas, la exposición a la luz o la oscuridad, la inundación, la temperatura, entre otros **(Bidabadi & Jain, 2020)**. Además, también influyen factores endógenos como el genotipo de la planta, la presencia de

heridas, la edad de las plantas donantes y el lugar de donde se tomaron los explantes **(Lian et al., 2022)**.

1.1.7.1. Explantes

El proceso de regeneración de plantas *in vitro* es un proceso complejo que varía dependiendo de la especie de la planta y la fuente del explante, los brotes o raíces adventicias pueden crecer directamente de los explantes de tejido que se han incubado *in vitro* **(Lardon & Geelen, 2020)**. Sin embargo, en la mayoría de los casos, es necesario regenerar órganos completos a partir de tejido calloso **(García-Fortea et al., 2020)**. Los factores exógenos como el estrés pueden influir en la expresión de reguladores del crecimiento y pueden afectar diferencialmente a vías de señalización específicas en diferentes explantes, dictando a su vez qué genes se expresan, alterando los perfiles metabólicos y epigenéticos de los explantes **(Bidabadi & Jain, 2020)**.

1.1.7.2.Medios

Los explantes se cultivan en un medio artificial compuesto por agua, macronutrientes y micronutrientes, alguna fuente de carbono, vitaminas, reguladores del crecimiento, y un agente gelificante **(Debnath & Goyali, 2020)**. La composición de los medios de cultivo y los reguladores del crecimiento varían según la especie de planta e incluso según los diferentes genotipos de la misma especie **(Guerrero C., 2021)**. El medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) tiene una baja concentración de sales, por lo cual es ampliamente utilizado en el cultivo de diferentes variedades de arándano, sin embargo debe ser complementado con fitohomonas para promover el crecimiento **(Wang et al., 2019)**.

1.1.7.3. Fitohormonas

Las fitohormonas actúan como mensajeros químicos que regulan las funciones celulares de la planta en sus distintos estadios, algunas de estas son (auxina, citoquinina, ácido giberélico, brasinoesteroides, etileno, ácido abscísico, ácido salicílico y ácido jasmónico) presentes en

todo el ciclo de vida de las plantas **(Hano, 2022)**. Toman un papel esencial como reguladores de distintas procesos fisiológicos y bioquímicos que dirigen el desarrollo de las plantas en condiciones adversas **(EL Sabagh et al., 2022)**.

Las citoquininas y auxinas son un grupo de hormonas vegetales sintetizadas de manera natural por la planta, intervienen en su metabolismo **(Kende & Zeevaart, 1997)**. Las auxinas se encuentran relacionadas principalmente con el desarrollo y crecimiento de brotes y raíces, intervienen en el proceso de embriogénesis, vascularización de tejidos y tropismos **(Berleth et al., 2004)**. Por su parte las citoquininas son capaces de promover la división celular, formación de meristemos en brotes, movilización de nutrientes y están involucradas en las respuestas hacia el estrés **(Frank & Schmülling, 1999)**.

1.1.7.3.1. Coadyubantes

El uso frecuente de carbón activado en la propagación de tejidos vegetales favorece el crecimiento y desarrollo de las células, debido a su capacidad para absorber compuestos del medio que son favorables para el crecimiento de las plantas **(Buckseth et al., 2018)**. La adición de carbón activado influye en el desarrollo de un mayor número de callos inducidos en tejido foliar, además tiene la capacidad de regular el pH **(Zawawi et al., 2021)**. Funciona también como antioxidante y promueve la absorción de citoquininas y auxinas, ya que su estructura porosa es capaz de capturar y liberar distintas moléculas **(Souza et al., 2021)**.

Aunque el agua de coco no es un componente esencial en el medio de cultivo de tejidos, se ha empleado para fomentar su crecimiento **(Cheng et al., 2020)**. El agua de coco puede actuar como un regulador del crecimiento vegetal debido a su contenido de zeatina, una citoquinina **(Zhang et al., 2024)**. Esta puede contribuir a varios aspectos del crecimiento vegetal, como la germinación de las semillas, la diferenciación de los tejidos, la división celular y el estímulo del crecimiento de los brotes. Además, el agua de coco contiene inositol, compuestos de nitrógeno reducido y aminoácidos, que promueven la elongación de los brotes **(Mondal et al., 2015)**.

1.2.Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar medios de cultivo y fitohormonas para la inducción de callogénesis a partir de dos explantes de arándano (*Vaccinium corymbosum L*) cv. Biloxi.

1.2.2. Objetivos específicos

- Definir la eficiencia de los medios de cultivo enriquecidos con agua de coco y carbón activado en la inducción de callos.

- Establecer la mejor dosis de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y Kinetina para la inducción de callos *in vitro* en arándano.

- Determinar el porcentaje de callos potencialmente embriogénicos.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizaron los equipos, materiales y reactivos que se especifican en las Tabla 2.

Tabla 2.

Recursos materiales que se utilizaron.

Recursos materiales	
Reactivos	
Medio WPM	Etanol 70 %
Agua de coco	Hipoclorito de sodio 2,25%
Carbón activado	Carbendazim
Kinetina	Python
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	Hidróxido de sodio
Zetina	Ácido clorhídrico
Agar para micropropagación	Acetocarmín
Agua destilada	Azul de metilo
Kinetina	
Equipos	**Materiales**
Cámara climática	Cajas Petri
Balanza analítica	Vasos de precipitación
Plancha de calentamiento	Botellas de vidrio de tapa azul
Potenciómetro	Bisturí y agujas estériles

Cámara de flujo laminar	Frasco ámbar
Autoclave	Mecheros de alcohol
Microondas	Pipetas
Microscopio óptico	Paquete de fundas Ziploc
Refrigeradora	Pinzas metálicas
	Film plástico
	Papel aluminio
	Frascos de tapa amarilla
	Hojas y flores de arándano

2.2. Métodos

2.2.1. Definir la eficiencia de los medios de cultivo enriquecidos con agua de coco y carbón activado en la inducción de callos.

2.2.1.1. Recolección y selección del material vegetal

El material vegetal (hojas y flores de arándano) se tomaron de plantas de 2 años de la variedad Biloxi, provenientes de los cultivos de la Granja Agroecológica y Demostrativa de Píllaro (Figura 6).



Figura 64. Ubicación del lugar donde se obtuvo el material vegetal.

Nota: Imagen satelital. Obtenida de **Google Maps (2023)**.

La selección se realizó de acuerdo con las condiciones físicas de las hojas, que no muestren signos de marchitamiento, clorosis, laceraciones en tejido, signos de ataque por plaga. En el caso de las flores además se verifico que se encuentren en estado de botón tardío. Se utilizó pinzas y tijeras estériles para cortar la base de las flores y hojas seleccionadas, el material vegetal se recolecto en recipientes herméticos y desinfectados y el traslado al laboratorio fue en condiciones de frio 6ºC según lo mencionado por **Zhou et al., (2023)**.

2.2.1.2. Desinfección del material vegetal

2.2.1.2.1. Desinfección de hojas

Las hojas se lavaron con agua corriente durante 5 minutos, después se sumergieron 15 minutos en agua con jabón. Posteriormente se lavó con una solución al 1% de Carbendazim y Python durante 15 minutos para su traslado a la cámara de flujo laminar. Dentro de la cámara se realizó un protocolo de desinfección basado en el trabajo de **Cappai et al, (2020**), para ello se colocó las hojas en una solución de etanol al 70% durante 3 minutos. A continuación, se sumergió el material vegetal en una solución de Hipoclorito de sodio al 2,25% durante 5 minutos. Entre cada inmersión con las diferentes soluciones se enjuago tres veces con agua destilada y al terminar se secaron en papel absorbente estéril. Todos los lavados con las soluciones se realizaron con agitación.

2.2.1.2.2. Desinfección de flores

Para las flores se utilizó el mismo protocolo sin embargo se redujo el tiempo de inmersión en cada una de las soluciones. Siendo 5 minutos en agua destilada, 10 minutos en agua con jabón, 10 en Carbendazim y Python, 3 minuto en etanol y 3 minutos en Hipoclorito de sodio, como se muestra en la Figura 7.

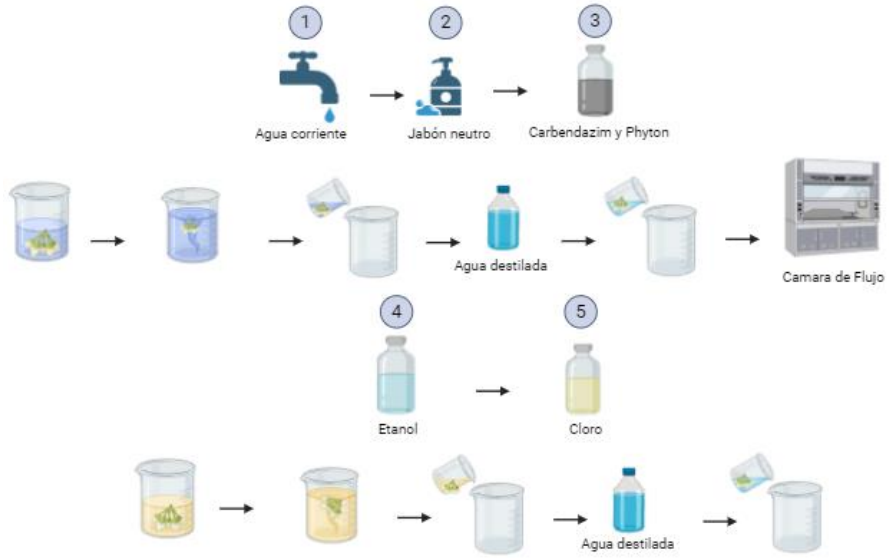


Figura 7*5*. Etapas de la desinfección del material vegetal.

2.2.1.3. Preparación de medios

Se utilizo como base el medio WPM, el mismo que tiene la composición según se describe en el Anexo 1, además se agregó 25 g / L de sacarosa y 10 g / L de agar. Finalmente se añadió como coadyuvante un 1% de carbón activado y un 5% de agua de coco a cada medio de cultivo correspondiente según se describe en la Tabla 3.

Tabla 3.

Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Medio base	Coadyuvante
1	WPM	-
2	WPM	Agua de coco
3	WPM	Carbón activado

2.2.1.4.Inducción de callos

2.2.1.4.1. Inducción de callos en hojas

Terminado el proceso de desinfección de las hojas, se procedió a cultivarlas en cajas Petri donde se colocaron 5 explantes por tratamiento. A las hojas se realizó un corte con un sacabocados para obtener circunferencias con diámetro de 10 mm, las hojas se colocaron de manera que el envés este en contacto con el medio. También se utilizó hojas provenientes de cultivo *in vitro*, debido a que el cultivo se realiza en condiciones asépticas no se necesitó desinfectar el tejido y se cultivó directamente en las placas. Los cultivos se realizaron por cuatriplicado.

2.2.1.4.2. Inducción de callos en flores

Terminado el proceso de desinfección de las flores, fueron cultivarlas en cajas Petri donde se colocaron 5 explantes por tratamiento. A las flores se cortó el peciolo hasta la base del cáliz y se colocaron sobre el medio de forma vertical. Los cultivos se realizaron por cuatriplicado.

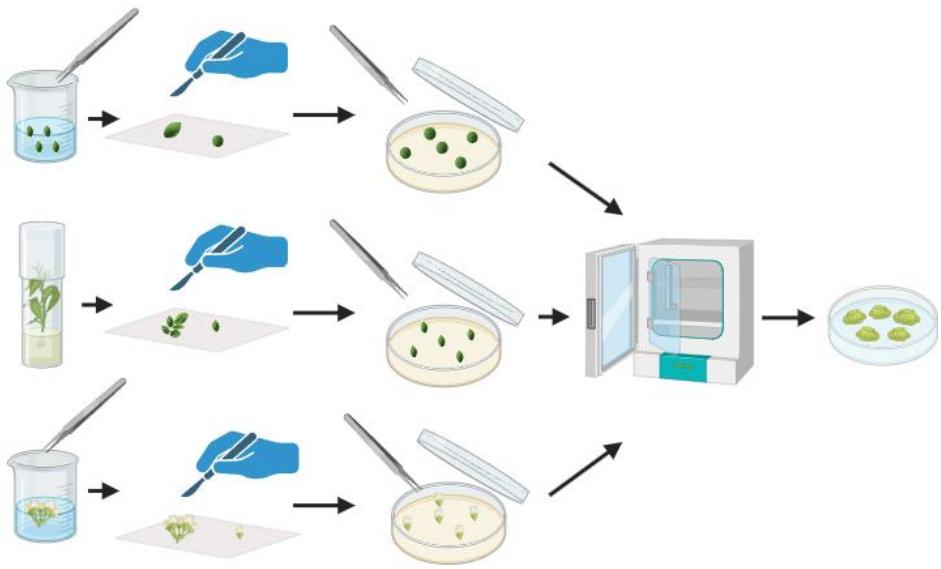


Figura 86. Inducción de callos

2.2.1.5. Incubación de material vegetal

El material vegetal sembrado en cada uno de los medios de cultivo se incubo a una temperatura de 25ºC, en ausencia de luz, durante 5 semanas, según lo mencionado por **Figiel-Kroczyńska *el al*, (2022).**

2.2.1.6. Variables evaluadas en la inducción de callos

Las variables evaluadas fueron: tiempo de inducción, consistencia del callo, tamaño de los callos (g) y color del callo como se detalla en la Tabla 4. La toma de datos se realizó a los 40 días después de la incubación.

Tabla 4.

Variables evaluadas

Color	Tamaño	Consistencia
Verde	Grande (cubriendo la mayor parte de la superficie del explante)	Friable
Amarrillo	Mediano (cubriendo el 50 % de la superficie del explante)	Compacto
Café	Pequeño (cubriendo el 25 % de la superficie del explante)	
	Necrótico	

2.2.2. Determinar la mejor dosis de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y Kinetina para la inducción de callos *in vitro* en arándano.

2.2.2.1.Diseño experimental

Se utilizo un diseño completamente al azar (DCA) donde se evaluaron dos tipos de explantes (hojas y flores) e incluyen 12 tratamientos (como se especifica en la Tabla 5) con 4 repeticiones para cada uno.

Tabla 5.

Tratamientos para inducción de callos: 3 tipos de medios de cultivo e interacción hormonal

Tratamiento	Medios de cultivo	Kinetina (mg/L)	2,4-D (mg/L)
1	WPM + Agua de coco	0.5	-
2	WPM + Agua de coco	3	-
3	WPM + Agua de coco	-	0.5
4	WPM + Agua de coco	-	2
5	WPM + Carbón activado	0.5	-
6	WPM + Carbón activado	3	-
7	WPM + Carbón activado	-	0.5
8	WPM + Carbón activado	-	2
9	WPM	0.5	-
10	WPM	3	-
11	WPM	-	0.5
12	WPM	-	2

- **Hipótesis**

Ho: La composición del medio de cultivo, interacción hormonal y el tipo de explante no influyen en la inducción de callos *in vitro* de arándano.

Ha: La composición del medio de cultivo, interacción hormonal y el tipo de explante influyen en la inducción de callos *in vitro* de arándano.

2.2.2.2. Preparación de medios de cultivo

El proceso de evaluación de medios de cultivo se utilizó como base al medio WPM (Anexo 1), además este contenía 25 g/L de sacarosa, 10 g/L de agar. Se agrego un 1% de carbón activado y un 5% de agua de coco al medio de cultivo correspondiente, posteriormente el pH del medio se ajustó a 5,2. Además, se le adicionaron dos concentraciones de 6-furfuril-aminopurina (KIN) y dos concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), como se describe en la Tabla 5.

2.2.2.3. Selección, desinfección e inducción del material vegetal

Para los procesos de selección, desinfección e inducción del material vegetal, se utilizaron los procedimientos descritos anteriormente en las secciones 2.2.1.1, 2.2.1.2 y 2.2.1.4. El material vegetal sembrado en cada uno de los tratamientos se incubo a una temperatura de 25ºC, en ausencia de luz, durante 5 semanas.

2.2.2.4. Análisis de datos

Se evaluó la tasa de inducción de los callos obtenidos por cada tratamiento. El análisis de datos se realizó de acuerdo con lo descrito por **Kharel *et al*, (2022)** donde, los datos se someterán al análisis de varianza (ANOVA) y la separación de medias se realizó utilizando la prueba de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey a $p \leq 0,05$ utilizando el software R Studio.

2.2.3. Determinación el porcentaje de callos potencialmente embriogénicos

La determinación del porcentaje de callos embriogénicos producidos se realizará de acuerdo con la metodología de **Gupta & Durzan, (1987)** al completarse la etapa de inducción de callo se procedió a la identificación de la viabilidad de los callos mediante su particular macro morfológica, como color y textura. Una vez identificados los callos con características viables a callo embriogénico se realiza un análisis histológico, mediante una tinción con acetocarmin al 2% y azul de metilo como contraste de una muestra para su visualización en el microscopio. Para calcular el porcentaje de callos embriogénicos se utilizó la siguiente formula:

$$\%\ Callos\ potencialmente\ embriogénicos = \frac{Callos\ viables}{Callos\ totales\ producidos} * 100 \quad [1]$$

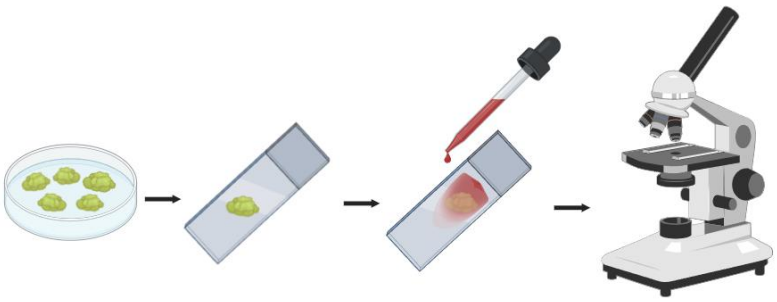


Figura 97. Tinción de callos embriogénicos

2.2.4. Subcultivos

Para el mantenimiento y proliferación de callos, los callos identificados como embriogénicos se subcultivaron en frascos que contenían medio WPM suplementado con 1 mg/L ZEA y medio WPM con 0,5 mg/L 2,4-D. Posteriormente, los frascos se incubaron en una cámara climática condiciones de fotoperiodo de luz/oscuridad 16/8 y temperatura de 28 °C. Se observaron durante 4 semanas.

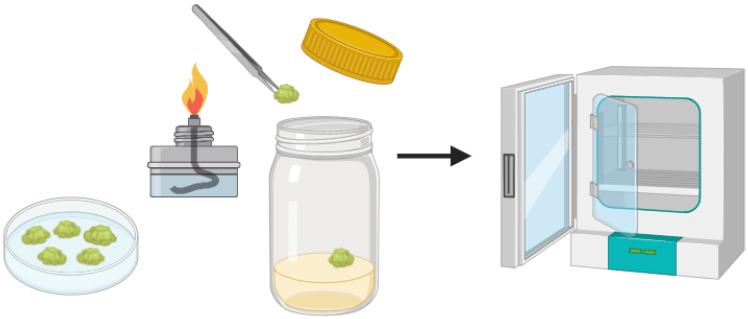


Figura 108. Subcultivo de callos embriogénicos

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.Análisis y discusión de los resultados.

3.1.1. Eficiencia de los medios de cultivo

Las hojas seleccionadas se evaluaron en 3 tratamientos en donde se agregó AC y CA al medio, además del medio WPM como control. Las hojas introducidas presentaron oxidación y nula formación de callo (Figura 11). **Mc-Caughey-Espinoza et al., (2020)** mencionan que la oxidación es causada principalmente por los agentes de desinfección utilizados en la asepsia del explante, sin embargo, también puede deberse a cortes, tiempo de permanencia, componentes en el medio, volumen y calidad del frasco de cultivo. El oscurecimiento del explante también se ha relacionado con otros desordenes fisiológicos, morfológicos, epigenéticos y genéticos, variación somaclonal y habituación **(Van Staden et al., 2006).** Por lo tanto, la oxidación observada puede deberse a diversos factores, como los mencionados anteriormente.



Figura 11. Explantes de hoja oxidados.

Debido a que los explantes de las hojas tomadas de un ambiente *ex vivo* resultaron inviables para esta investigación, se tomaron hojas de plantas que ya se encontraban establecidas en

condiciones *in vitro*. Este tipo de explante cuenta con la ventaja de estar menos expuesto a procesos que generan estrés. Además, al encontrarse creciendo en un medio estéril, sus procesos fisiológicos se encuentran habituados a un medio de cultivo que tiene una disponibilidad de nutrientes preestablecida y adecuada para la especie, lo cual resulta en un mejor desarrollo **(Gurav et al., 2020)**.

Estos beneficios se vieron reflejados en una tasa de inducción con valores más favorables como se observa en la Figura 12. Entre el medio al cual se agregó AC y CA, se obtuvo una diferencia del 60%, mostrando que el medio con CA no es viable para la generación de callos al tener un 0% de tasa de inducción. Al comparar con el control tenemos una diferencia del 20% con respecto al AC, lo cual no representa una diferencia significativa. **Zhang et al., (2024)** mencionan que, el agua de coco puede aportar algunas citoquinas que pueden mejoran el rendimiento en cuanto a la generación de callos o brotes, sin embargo, las concentraciones en las que se encuentran estas hormonas hacen que pueda ser prescindible.

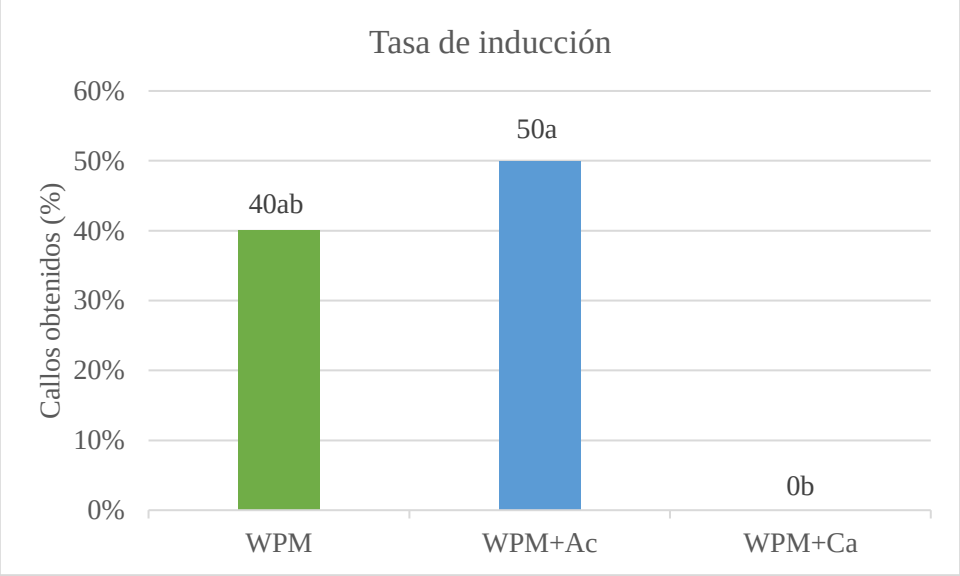


Figura 12. Porcentaje de inducción de callos en hojas.

Nota: Los datos presentados son las medias del porcentaje de inducción. Las letras sobre las barras representan que hay diferencia estadísticamente significativa (p<0,05) entre los tratamientos.

Las flores se recolectaron en estado de botón tardío y el método de desinfección fue más delicado en comparación de hojas. La tasa de inducción fue mayor que en el caso de las hojas tomadas *ex vivo* y las hojas tomadas de plantas establecidas *in vitro*. Las flores tiene disponibilidad de varios tejidos diferenciados como pétalos, estambres, ovarios y pistilos que

individualmente pueden utilizarse como explantes, por lo cual, al ser expuestas a un medio que propicie la formación de callos es más probable que genere este tipo de estructuras **(Raikar et al., 2024)**.

En la Figura 13 se muestra la tasa de inducción de callos para flores se obtuvo una diferencia del 15% entre el WPM+AC y el WPM+CA, siendo este último el que muestra un porcentaje de 55%, por otro lado, el medio solo con WPM alcanzo un 70%. Al realizar el análisis estadístico ANOVA (Tabla 10) se mostró que no existe una diferencia significativa entre el medio solo con WPM y la adición de AC o CA. De tal manera que si se deseara promover callos sería viable utilizar el medio WPM solo.

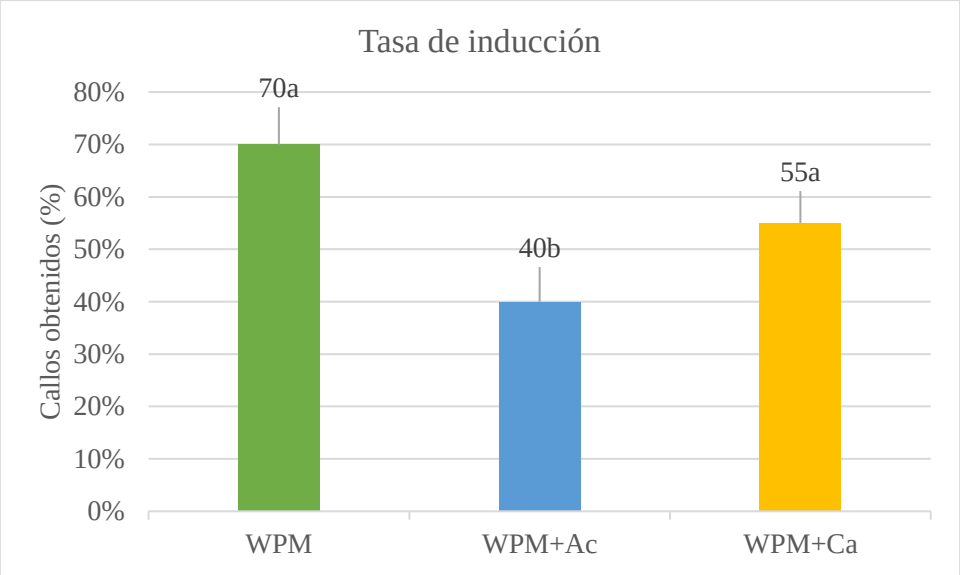


Figura 13. Porcentaje de inducción de callos en flores

Nota: Los datos presentados son las medias del porcentaje de inducción. La letra sobre las barras representa que no hay diferencia estadísticamente significativa (p<0,05) entre los tratamientos.

Como se observa en la Figura 14 gran parte de los callos obtenidos de flores que crecieron en el medio WPM fueron friables alcanzando un 60%, mientras que un 20% fueron compactos. El medio con AC mostro un 30% de callos friables y un 0% compactos. Mientras que, en el medio con CA mostro un desarrollo total ligeramente mayor al AC con un 20% de callos friables y un 35% de callos compactos. Los porcentajes que no se mencionan corresponden a callos que no crecieron o cuyos explanes murieron. En la investigación realizada por

Rodríguez Beraud et al., (2014) menciona que la consistencia de un callo debe ser friable ya que tiene mayor capacidad de diferenciarse y regenerar brotes o raíces.

Se observó que el porcentaje de callos friables puede estar relacionado con el color y el tiempo de aparición del callo, en el caso de las flores, su desarrollo empiezo alrededor de las 72h. De manera que no todos los explantes proliferan de forma homogénea, por lo cual mientras que unos callos "medianos" mantienen un color amarillo transparente junto con una consistencia friable otros "grandes" empiezan a tomar un color café manteniendo la misma consistencia. Por otro lado, los callos poco desarrollados, mantienen un color verde claro con una consistencia compacta ya que aún no crecen lo suficiente. Además en la investigación sobre regeneración *in vitro* de arándanos realizada por **Zhou et al., (2023)** menciona que los callos de color amarillo claro tuvieron una mejor proliferación, mientras que los de color café murieron. En cualquiera de los casos existen algunos callos que empiezan a oscurecerse y morir, esto puede deberse a los mismos procesos fisiológicos de oxidación, que en el caso de especies leñosas es especialmente crítico **(Debnath & Ghosh, 2022)**.

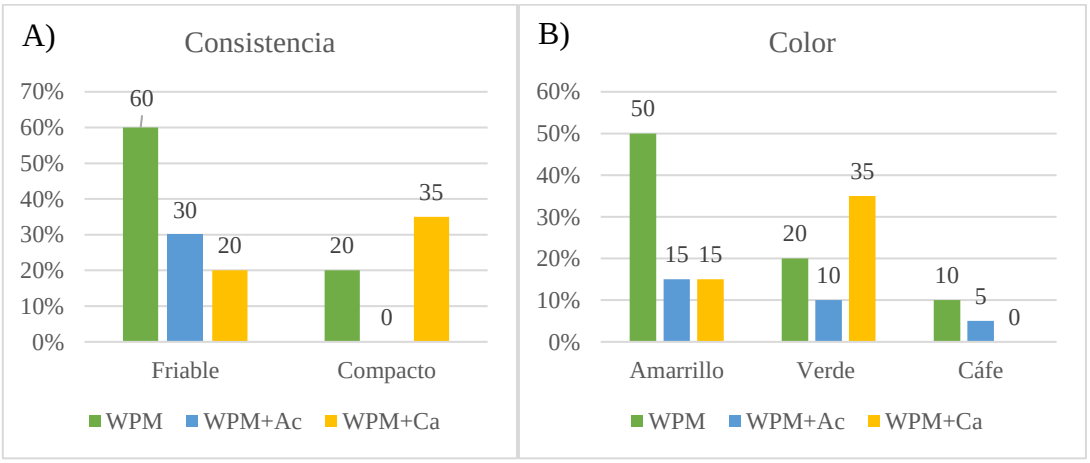


Figura 14. Consistencia y color de los callos obtenidos por flores.

Nota: A. Porcentaje de callos friables y compactos. **B.** Porcentaje de callos amarrillos, verdes y cafes. Los callos fueron obtenidos a partir de flores en medios de cultivo WPM, WPC + Agua de coco y WPM + Carbon activado a los 5 dias.

Los callos obtenidos por hojas muestran un comportamiento en consistencia y color parecido a los obtenidos por flores, con la diferencia de que su tiempo de aparición es mayor,

aproximadamente a partir del día 20. En la Figura 15 se observa el color y la consistencia del medio con AC, donde se obtuvo un 30% de callos friables y amarrillos y un 20% de callos compactos y cafés siendo este el mejor tratamiento en comparación con el medio de WPM con un porcentaje de 10% para callos friables y amarrillos. El color del callo es un también puede considerarse como un indicador de viabilidad que depende de la composición del medio por lo que añadir AC que contiene una combinación de citoquininas las cuales forman parte de la composición puede hacer la diferencia **(Krupa-Małkiewicz et al., 2024).**

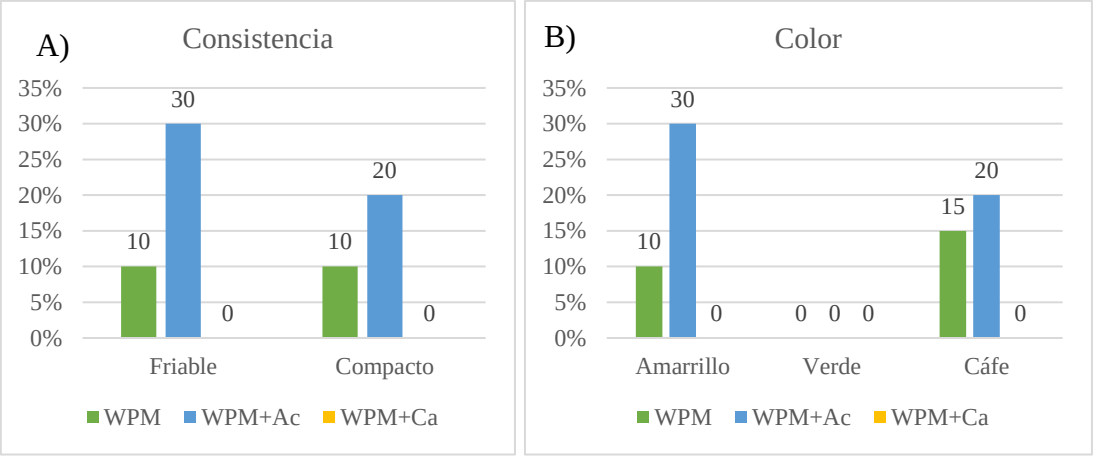


Figura 15. Consistencia y color de los callos obtenidos por hojas.

Nota: A. Porcentaje de callos friables y compactos. **B.** Porcentaje de callos amarrillos, verdes y cafes. Los callos fueron obtenidos a partir de hojas en medios de cultivo WPM, WPC + ACy WPM + CA a los 30 dias.

En la Figura 16A se observa que los callos obtenidos por hojas en el medio WPM+CA el 100% de los callos son necróticos, siendo el medio más ineficiente, seguido del medio WPM con el 75% y finalmente con el medio WPM+AC con el 50%. El resto de los callos obtenidos se encuentran en los rangos de Mediano y Pequeño. En comparación los callos obtenidos por flores tienen mejores resultados en el tamaño y el porcentaje de callos necróticos como se observa en la Figura 19B, donde el medio WPM+AC obtuvo 60% de los callos son necróticos, siendo el medio más ineficiente, seguido del medio WPM+AC con el 45% y finalmente con el medio WPM con el 30%.

Según **Thomas, (2008)** menciona que una de las dificultades de trabajar con carbón activado es que debido a su porosidad además de absorber sustancias no deseadas en el medio, puede

absorber vitaminas e iones metálicos limitando su disponibilidad para el explante y provocando su muerte. El medio WPM+CA al no tener hormonas que promuevan a la inducción de callos y limitando los suplementos del medio concuerda que exista mayor porcentaje de callos necróticos.

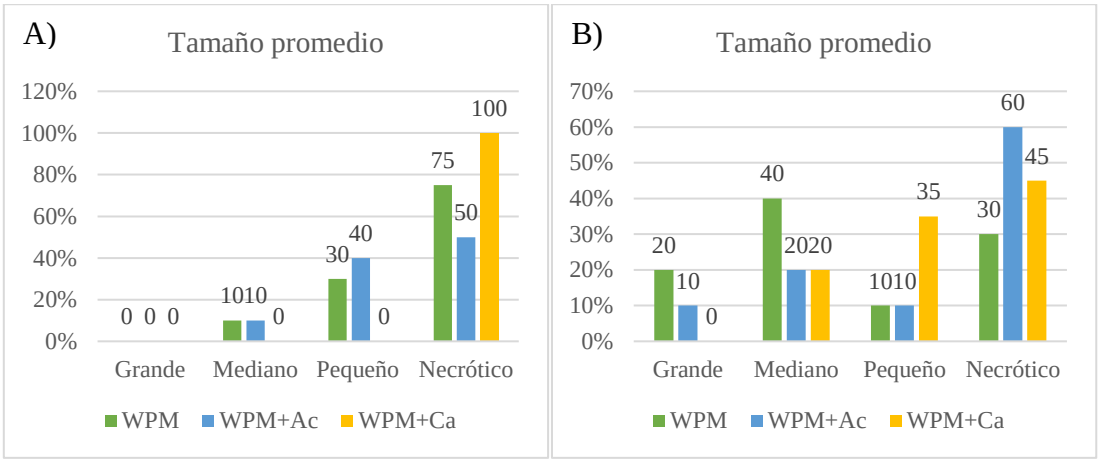


Figura 16. Tamaño promedio (g) de callos obtenidos por **A**. Hojas y **B**. Flores

El análisis ANOVA para el porcentaje de inducción en flores se obtuvo un valor p=0,0248 (Tabla 9) que al ser > 0,05 indica que no existe una diferencia significativa en cuanto al efecto de la composición del medio de cultivo en el desarrollo de callos en flores. Mientras que el análisis ANOVA para la tasa de inducción de callos obtenidos por hojas mostro que p=0,1274 (Tabla 11) que al ser < 0,05 lo que indica la existencia de una diferencia en cuanto al efecto del medio en el desarrollo de los callos, esto se debe a que en el medio con carbón activado no hubo ningún crecimiento.

La eficiencia de los medios de cultivo enriquecidos con agua de coco y carbón activado sin agregar hormonas difiere según el tipo de explante, según **Ikeuchi et al., (2013)** esto podría deberse al estado metabólico activo de explante, en las hojas los callos son inducidos por heridas, mientras que el estado de botón floral influye una respuesta bioquímica que genera el callo.

3.1.2. Dosificación de fitohormonas en medios de cultivo

Para lograr determinar la mejor dosis de fitohormonas se agregaron dos concentraciones de 2,4-D y dos concentraciones de KIN. Como se observa en la Figura 17 el porcentaje máximo

de inducción fue del 75% correspondiente al tratamiento dos (WPM+AC+3mg/L KIN) y al tratamiento nueve (WPM+0,5 mg/L KIN). Con la tasa de inducción mostrada se puede inferir que la dosis de KIN utilizada favorece la capacidad de división celular que más adelante puede ser capaz de formar callos a partir de las flores, esto relacionado con el estado fenológico en el cual se encuentran. Conforme al estudio de **Zhou et al., (2023)** se demuestra que una dosis adecuada de citoquininas puede promover la inducción de callos, mientras que una dosis baja disminuye esta capacidad.

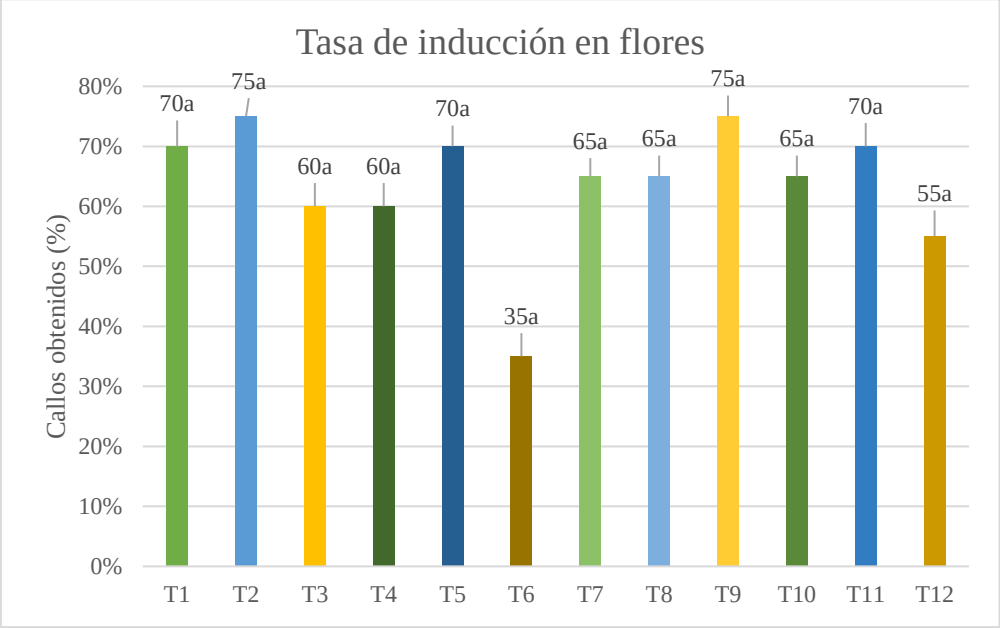


Figura 17. Porcentaje de inducción en flores

Nota: Los datos presentados son las medias del porcentaje de inducción. La letra sobre las barras representa que no hay diferencia estadísticamente significativa (p<0,05) entre los tratamientos.

La consistencia y el color de los callos en flores (Anexo 5) se comportaron de manera similar a los medios en donde no se agregó fitohormonas, con la diferencia de una mayor incidencia de callos de color amarillo, en el tratamiento uno (WPM+AC+0,5mg/L KIN) con un 65% y en tratamiento siete (WPM+CA+0,5mg/L 2,4-D) con un 60%. En cuanto la consistencia, se obtuvo que estos mismos tratamientos presentan mayor porcentaje de callos friables con un 70% y 75% respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por **Raikar et al.,(2024)** donde se obtuvo mayor inducción de callos en los tratamientos suplementados con 2,4-D en botones florales de *Acca sellowiana*, los mismos que tuvieron una consistencia friable. El

tratamiento seis (WPM+CA+3mg/L KIN) mostro el peor rendimiento, en donde un 65% de los callos murieron o no crecieron.

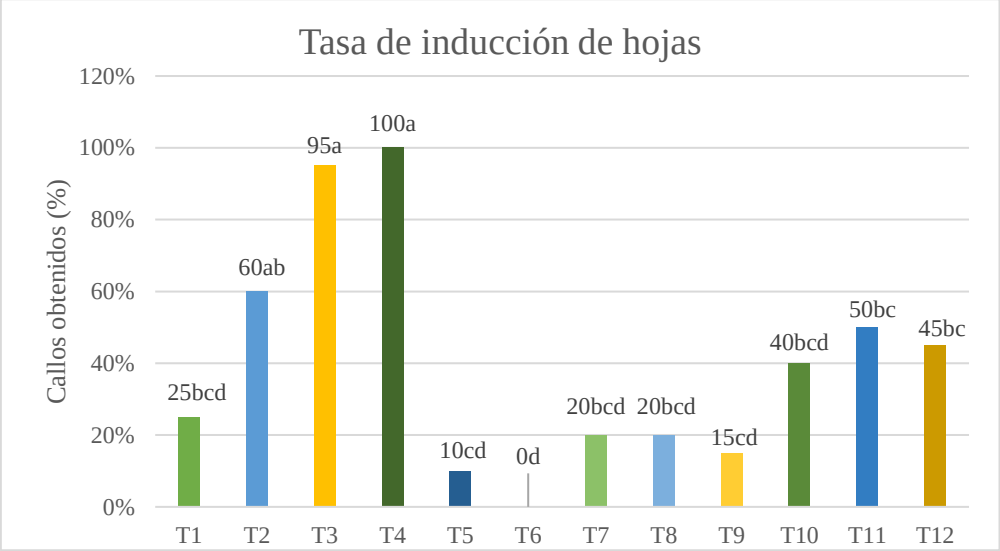


Figura 18. Porcentaje de inducción en hojas

Nota: Los datos presentados son las medias del porcentaje de inducción. Aquellas letras diferentes sobre las barras representan que hay diferencia estadísticamente significativa (p<0,05) entre los tratamientos.

De acuerdo con la Figura 18, el tratamiento tres (WPM+AC+0,5 mg/L 2,4-D) y cuatro (WPM+AC+2 mg/L 2,4-D) mostraron un gran porcentaje de tasa de inducción, siendo un 95% y 100% respectivamente. En un estudio realizo por **Bhanupriya & Kar, (2024)** en *Sorghum bicolor* se obtuvo una tasa de formación de callos significativa de 91,33% para el medio sumplementado con agua de coco en combinación con 2,4-D, lo cual concuerda con nuestros resultados a pesar de ser especies diferentes. De acuerdo con **Cheng et al., (2020)** el agua de coco contiene múltiples componentes que pueden ayudar a la inducción de callos, entre ellos cierta cantidad de citoquinas que interactúan de manera sinérgica con el 2,4-D de tal manera que promueven un crecimiento optimo del callos.

Se observa que los tratamientos del cinco al nueve tienen la peor tasa de inducción. A excepción del tratamiento nueve, los demás cuentan con CA en la preparación del medio. La capacidad del carbón activado para encapsular las hormonas puede haber afectado a los requerimientos nutricionales de las hojas **(Souza et al., 2021)**. Los controles mostraron un comportamiento mediocre en comparación a los tratamientos tres y cuatro, pero bastante similares a los que contenían KIN. **Handayani et al., (2019)** menciona que este tipo de promotor de crecimiento

necesita de una dosis muy específica para lograr un desarrollo óptimo de callos y encontrar una dosis adecuada puede resultar complicada. Según **Zawawi et al., (2021)** la 2,4-D es una auxina que interviene en gran medida en el proceso de diferenciación y formación de órganos vegetales, por lo cual en una dosis adecuada acelera el proceso de callogénesis.

La consistencia y el color de los callos en hojas (Anexo 6) se observa una mayor incidencia de callos de color amarillo, en el tratamiento cuatro (WPM+AC+2 mg/L 2,4-D) con un 80% y en tratamiento tres (WPM+AC+0,5 mg/L 2,4-D) con un 60%. En cuanto la consistencia, se obtuvo que estos mismos tratamientos presentan mayor porcentaje de callos friables con un 85% y 80% respectivamente.

Las flores resultaron ser mucho más eficientes como explante para la generación de callos, mostraron mejores resultados en cuanto a cantidad y calidad de callos. El no presentar diferencias significativas con medio de control que solo contenía WPM puede estar relacionado con lo mencionado con **Debnath & Ghosh, (2022)** en donde la formación de callos sin el uso de hormonas exógenas puede estar relacionada por la fase de transición del botón floral. Ya que, durante esta etapa, se producen interacciones complejas entre varios factores, incluyendo hormonas vegetales, poliaminas, ácidos giberélicos y citoquininas, que pueden impulsar la promoción de estos **(Raikar et al., 2024)**.

3.1.3. Porcentaje de callos embriogénicos

Al completarse la etapa de inducción tanto en hojas como en flores se obtuvo un total de 114 callos y 188 callos respectivamente. Utilizando la Ecuación 1 se calculó el porcentaje de callos embriogénicos obteniendo 51,75% y 62,76% para los callos producidos por hojas y flores respectivamente. El mayor porcentaje de callos embriogénicos son obtenidos por flores lo que puede significar una mayor capacidad de inducción de embriogénesis en comparación con los callos obtenidos en hojas. En investigaciones similar se termina el porcentaje de callos embriogénicos basados en su capacidad de regeneración **(Schuchovski et al., 2020)**.

Los callos con características viables para callo potencialmente embriogénico como color amarrillo y consistencia friable se sometieron a un análisis histológico, mediante una tinción con acetocarmín y azul de metilo como contraste. El acetocarmín es un colorante básico que se une intensamente a los núcleos de las células embriogénicas debido a su alta actividad mitótica,

mientras que el azul de metileno se une al citoplasma y las paredes celulares, facilitando la diferenciación entre las células **(Malatesta, 2016)**.

Las células embriogénicas en la mayoría de las estructuras de las células del contorno se tiñeron de azul de metilo y por dentro de una combinación de ambos tintes dando una coloración morada (Figura 19B-C). De acuerdo al estudio de factores que regulan la regeneración de brotes de arándano de **(Omori et al., 2024)**, observaron que el conjunto de células embriogénicas teñidas de azul y son relativamente redondeadas. **(Capelo et al., 2010)** mencionan que los callos embriogénicos muestran un citoplasma denso y un núcleo prominente y altamente irregular, además de una pared celular más gruesa. Esta descripción concuerda con lo observado en la Figura 19D, la célula tiene forma redondeada y alargada, citoplasma denso y pared bien definida (Figura 19D).

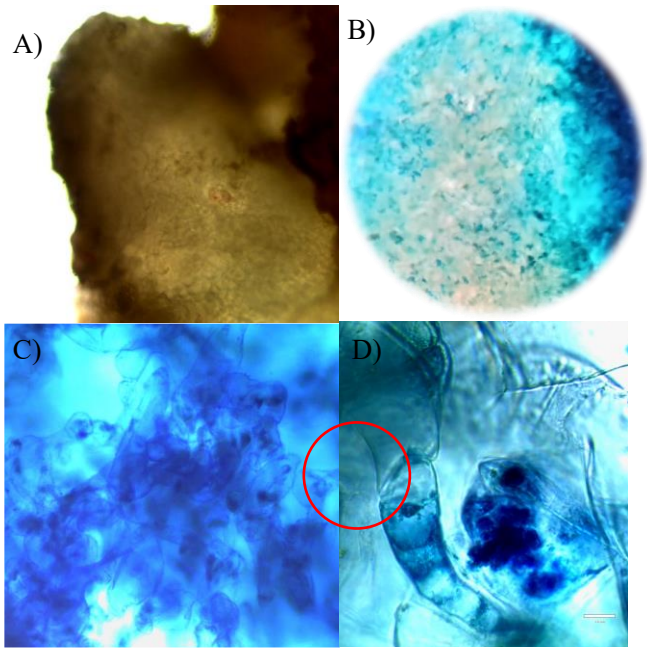


Figura 19. Corte histológico de callo

Nota: A. Visualización del callo sin tinte B. Tinción diferencial de callo potencialmente embriogénico (10X) C. Tinción diferencial de callo potencialmente embriogénico (40X) B. Tinción diferencial de callo potencialmente embriogénico (100X)

3.1.4. Subcultivos

El subcultivo regular de callos es crucial para mantener su viabilidad y promover la proliferación celular. Además, los subcultivos mejoran la homogeneidad y calidad de los cultivos de los callos en diversas especies vegetales **(Indriani et al., 2020)**. Con respecto al medio de cultivo WPM + 1mg/L ZEA muestra ser mejor para el mantenimiento ya que los callos presentan aumento de tamaño y poca oxidación en comparación con el medio WPM + 0,5 mg/L 2,4-D (Tabla 6).

Tabla 6.

Observaciones semanales de medios para subcultivo

Semana	Medio	Observación
1	WPM + 1mg/L ZEA	No existió cambios.
	WPM + 0,5 mg/L 2,4-D	No existió cambios.
2	WPM + 1mg/L ZEA	No existió cambios.
	WPM + 0,5 mg/L 2,4-D	Los callos empiezan a oxidarse.
3	WPM + 1mg/L ZEA	Los callos tienen poca oxidación.
	WPM + 0,5 mg/L 2,4-D	No existió cambios.
4	WPM + 1mg/L ZEA	Crecimiento significativo de los callos.
	WPM + 0,5 mg/L 2,4-D	Los callos tienen una oxidación significativa.

Los resultados observados concuerdan con lo encontrado por **Ghosh et al., (2018)** donde el medio basal suplementado con zeatina es óptimo para el mantenimiento y el alargamiento del cultivo de brotes en cultivos *in vitro* de arándanos altos, medio altos e híbridos. Por otro lado, el 2,4-D al ser una auxina endógena que ayuda a la división mitótica durante la inducción, también funciona como medio de mantenimiento **(Tuesta & Chico-Ruiz, 2016)**.

3.2.Verificación de la hipótesis

Para evaluar la influencia de explante se realizó un análisis de varianza AxBxC teniendo como factores composición del medio, interacción hormona y tipos explante (Tabla 7).

Tabla 7.

Análisis de varianza MEDIO x HOMONA x EXPLANTE

Factores	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón - F*	*Valor-P*
Medio (M)	1,5025	2	0,7513	23,115	1,76e-08 ***
Hormona (H)	0,5733	3	0,1911	5,880	0,0012 **
Explante (E)	1,5000	1	1,5000	46,154	2,65e-09 ***
M x H	0,5142	6	0,0857	2,637	0,0228*
M x E	1,1425	2	0,5863	18,038	4,46e-7 ***
H x E	0,8400	3	0,2800	8,615	5,83e-05 ***
M x H x E	0,5375	6	0,0896	2,756	0,0181 *
Error	2,3400	72	0,0325		

*El asterisco (*) indica el nivel de significancia estadística de los factores y las interacciones en el modelo. Siendo ***: Extremadamente significativo **: Muy significativo y *: Significativo*

Los factores de composición del medio, interacción hormona y tipos explante y sus interacciones tanto dobles como triples, tiene efecto significativo en la tasa de inducción de callos, por lo tanto:

- Se rechaza la hipótesis nula
- Se acepta la hipótesis alternativa, la composición del medio de cultivo, la interacción hormonal y el tipo de explante afectan a la inducción de callos *in vitro* de arándano.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1.Conclusiones

- En base a los resultados obtenidos, se determinó que los medios de cultivo suplementados con agua de coco y carbón activado no presentaron diferencias significativas en la inducción de callos de arándano (*V. corymbosum L*) var. Biloxi con respecto al control para los dos tipos de explantes, Sin embargo, la eficiencia de la utilización de estos suplementos está ligado a su interacción con fitohormonas.
- En la evaluación de dosis de las hormonas KIN y 2,4-D en dos concentraciones, se estableció que, para callos obtenidos por hojas existe una mayor inducción en los tratamientos con 2,4-D, siendo el de mejor rendimiento el tratamiento cuatro (WPM+AC+2mg/L 2,4-D) y en el caso de la KIN el tratamiento dos (WPM+AC+3mg/L KIN).
- Con respecto a la dosificación de hormonas para los callos obtenido por flores se encontró que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos, por lo tanto, la hormona KIN a 0,5 mg/L y 3 mg/L y la hormona 2,4-D KIN a 0,5 mg/L y 2 mg/L funcionan para la inducción de callos.
- La comparación del resultado de tasa de inducción obtenidos a partir de hojas y flores muestra que, composición del medio, interacción hormona, el tipo de explante y sus interacciones, tiene efecto significativo en la tasa de inducción de callos.
- En la doble tinción diferencial con acetocarmin y azul de metileno se determinó que el porcentaje de callos embriogénicos fue de 51,75% y 62,76% para los callos producidos por hojas y flores respectivamente.

4.2.Recomendaciones

- Realizar subcultivos continuos luego de 4 semanas para ayudar a la proliferación.

- Evaluar diferentes tipos de fitohormonas que puedan favorecer a la inducción de callogénesis a partir de botones florales en arándanos.

- Realizar el establecimiento de suspensiones celulares posterior a la inducción de callos para evaluar la producción de metabolitos secundarios.

- Investigar otros medios de cultivos enfocados en diferenciación de órganos vegetales con el fin de obtener un protocolo de regeneración de la planta completa.

- Determinar las condiciones de incubación adecuadas para los botones florales, enfocándose en la temperatura ya que este factor puede afectar la formación eficiente de callos.

CAPITULO V

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrocalidad. (2022). Arándanos ecuatorianos ya conquistan el mercado de Estados Unidos – AGROCALIDAD. *El nuevo Ecuador*. https://www.agrocalidad.gob.ec/arandanos-ecuatorianos-ya-conquistan-el-mercado-de-estados-unidos/

Agrocalidad. (2023, octubre 4). *Ecuador entra a competir en el mercado internacional de arándanos – Ministerio de Agricultura y Ganadería*. https://www.agricultura.gob.ec/ecuador-entra-a-competir-en-el-mercado-internacional-de-arandanos/

An, H., Meng, J., Xu, F., Jiang, S., Wang, X., Shi, C., Zhou, B., Luo, J., & Zhang, X. (2018). *Rooting Ability of Hardwood Cuttings in Highbush Blueberry (Vaccinium corymbosum L.) Using Different Indole-butyric Acid Concentrations*. https://doi.org/10.21273/HORTSCI13691-18

Baenas, N., Ruales, J., Moreno, D. A., Barrio, D. A., Stinco, C. M., Martínez-Cifuentes, G., Meléndez-Martínez, A. J., & García-Ruiz, A. (2020). Characterization of Andean Blueberry in Bioactive Compounds, Evaluation of Biological Properties, and *In Vitro* Bioaccessibility. *Foods*, *9*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/foods9101483

Baldomero, N., Alavez, Y., & Domínguez, V. J. M. (2017). MANEJO AGRONÓMICO DEL CULTIVO DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum L.*) EN LA SIERRA NORTE DE OAXACA. *Universidad & ciencia*, *6*, 138–155.

Bañados, P., Donnay, D., & Uribe, P. (2007). Poda en verde en arándanos. *Revista Agronomía y Forestal Pontificia Universidad Católica de Chile*, *No 31*, 16–19.

Berleth, T., Krogan, N. T., & Scarpella, E. (2004). Auxin signals—Turning genes on and turning cells around. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*(5), 553–563. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.07.016

Bhanupriya, C., & Kar, S. (2024). Callus-mediated organogenesis and regeneration of *Sorghum bicolor* under the influence of natural and synthetic growth regulators. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. https://doi.org/10.1007/s11627-024-10427-y

Bidabadi, S. S., & Jain, S. M. (2020). Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of *In Vitro* Plant Regeneration. *Plants*, *9*(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/plants9060702

Buckseth, T., Singh, R. K., Sharma, A. K., Sharma, S., Moudgil, V., & Saraswati, A. (2018). Optimization of Activated Charcoal on *in vitro* Growth and Development of Potato (*Solanum tuberosum L.*). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *7*(10), 3543–3548. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.710.410

Cadena, R. (2022). *La biotecnología como herramienta para la conservación de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura en Ecuador*. *Vol 4*(No 8), Páginas 13-16.

Capelo, A. M., Silva, S., Brito, G., & Santos, C. (2010). Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *103*(2), 237–242. https://doi.org/10.1007/s11240-010-9773-x

Cheng, Z., Hian, S., Mahmud, H. R. S., & Ling, N. (2020). Preliminary Study on Micropropagation of *Hylocereus polyrhizus* with Waste Coconut Water and Sucrose. *Materials Science Forum*, *981*, 316–321. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.981.316

Debnath, S. C. (2007). Strategies to propagate *Vaccinium* nuclear stocks for the Canadian berry industry. *Canadian Journal of Plant Science*, *87*(4), 911–922. https://doi.org/10.4141/P06-131

Debnath, S. C., & Ghosh, A. (2022). Phenotypic variation and epigenetic insight into tissue culture berry crops. *Frontiers in Plant Science*, *13*. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1042726

Debnath, S. C., & Goyali, J. C. (2020). *In Vitro* Propagation and Variation of Antioxidant Properties in Micropropagated *Vaccinium* Berry Plants—A Review. *Molecules*, *25*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/molecules25040788

EL Sabagh, A., Islam, M. S., Hossain, A., Iqbal, M. A., Mubeen, M., Waleed, M., Reginato, M., Battaglia, M., Ahmed, S., Rehman, A., Arif, M., Athar, H.-U.-R., Ratnasekera, D., Danish, S., Raza, M. A., Rajendran, K., Mushtaq, M., Skalicky, M., Brestic, M., … Abdelhamid, M. T. (2022). Phytohormones as Growth Regulators During Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Frontiers in Agronomy*, *4*. https://doi.org/10.3389/fagro.2022.765068

Frank, M., & Schmülling, T. (1999). Cytokinin cycles cells. *Trends in Plant Science*, *4*(7), 243–244. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01425-9

García-Fortea, E., Lluch-Ruiz, A., Pineda-Chaza, B. J., García-Pérez, A., Bracho-Gil, J. P., Plazas, M., Gramazio, P., Vilanova, S., Moreno, V., & Prohens, J. (2020). A highly efficient organogenesis protocol based on zeatin riboside for *in vitro* regeneration of eggplant. *BMC Plant Biology*, *20*(1), 6. https://doi.org/10.1186/s12870-019-2215-y

Ghosh, A., Igamberdiev, A. U., & Debnath, S. C. (2018). Thidiazuron-induced somatic embryogenesis and changes of antioxidant properties in tissue cultures of half-high blueberry plants. *Scientific Reports*, *8*, 16978. https://doi.org/10.1038/s41598-018-35233-6

Gordó, M. (2011). *Guía práctica para el cultivo de Arándanos en la zona norte de la provincia de Buenos Aires*. San Pedro: INTA. https://n9.cl/fl6nr

Guerrero C., J. D. (2021). *Micropropagación de árandano azul (Vaccinium corymbosum L.): Revisión de literatura* [Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2021]. https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/7089

Guo, Y.-X., Zhao, Y.-Y., Zhang, M., & Zhang, L.-Y. (2019). Development of a novel *in vitro* rooting culture system for the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) seedlings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *139*(3), Article 3. https://doi.org/10.1007/s11240-019-01702-7

Gupta, P. K., & Durzan, D. J. (1987). Biotechnology of Somatic Polyembryogenesis and Plantlet Regeneration in *Loblolly Pine*. *Bio/Technology*, *5*(2), Article 2. https://doi.org/10.1038/nbt0287-147

Gurav, S. S., Gurav, N. S., Patil, A. T., & Duragkar, N. J. (2020). Effect of Explant Source, Culture Media, and Growth Regulators on Callogenesis and Expression of Secondary Metabolites of *Curcuma Longa*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, *26*(2), 172–190. https://doi.org/10.1080/10496475.2019.1689542

Handayani, Rd. S., Yunus, I., Sayuti, M., & Irawan, E. (2019). In-vitro Callus Induction of Durian (*Durio zibethinus Murr*.) Leaves Using Kinetin and 2,4-D (Dichlorophenoxyacetic acid). *Journal of Tropical Horticulture*, *2*(2), Article 2. https://doi.org/10.33089/jthort.v2i2.23

Hano, C. (2022). *Plant Hormones: Recent Advances, New Perspectives and Applications*. BoD – Books on Demand.

Hicks, B. J. (2011). *Pollination of Lowbush Blueberry (Vaccinium angustifolium) in Newfoundland by native and introduced bees*.

Huylenbroeck, J. V., & Foucher, F. (2023). *XXXI International Horticultural Congress (IHC2022): International Symposium on Innovations in Ornamentals: from Breeding to Market*. International Society for Horticultural Science. https://pureportal.ilvo.be/nl/publications/xxxi-international-horticultural-congress-ihc2022-international-s

IBO. (2023). Global State Of The Blueberry Industry Report 2023. *Blueberry International Organization*. https://www.internationalblueberry.org/2023-report/

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*, *25*(9), 3159–3173. https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053

Indriani, R., Prihastanti, E., Budihastuti, R., & Nurchayati, Y. (2020). Effect of Subculture Frequency Toward Growth And Carotenoid Content from Tomato (*Lycopersicon Esculentum Mill.*) Callus. *Jurnal Biodjati*, *5*(2), Article 2. https://doi.org/10.15575/biodjati.v5i2.5840

Kende, H., & Zeevaart, J. (1997). The Five "Classical" Plant Hormones. *The Plant Cell*, *9*(7), 1197–1210.

Kharel, P., Creech, M. R., Nguyen, C. D., Vendrame, W. A., Munoz, P. R., & Huo, H. (2022). Effect of explant type, culture medium, and BAP concentration on *in vitro* shoot development in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*) cultivars. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *58*(6), 1057–1065. https://doi.org/10.1007/s11627-022-10299-0

Kramer, J., Simnitt, S., & Calvin, L. (2023, octubre 5). *Fruit and Tree Nuts Outlook: September 2021*. http://ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=102266

Krupa-Małkiewicz, M., Ochmian, I., & Figiel-Kroczyńska, M. (2024). Organic Supplementation of *Vaccinium corymbosum* Micropropagation Media. En F. Maghuly (Ed.), *Plant Functional Genomics: Methods and Protocols, Volume 2* (pp. 197–207). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3782-1_11

Kuepper, G. L., Diver, S., & Ames, G. K. (2004). Blueberries: Organic Production. *Horticulture Production Guide*.

Lardon, R., & Geelen, D. (2020). Natural Variation in Plant Pluripotency and Regeneration. *Plants*, *9*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/plants9101261

Lian, Z., Nguyen, C. D., Liu, L., Wang, G., Chen, J., Wang, S., Yi, G., Wilson, S., Ozias-Akins, P., Gong, H., & Huo, H. (2022). Application of developmental regulators to improve in planta or *in vitro* transformation in plants. *Plant Biotechnology Journal*, *20*(8), 1622–1635. https://doi.org/10.1111/pbi.13837

Long, Y., Yang, Y., Pan, G., & Shen, Y. (2022). New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, *13*. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.926752

Malatesta, M. (2016). Histological and Histochemical Methods—Theory and Practice. *European Journal of Histochemistry : EJH*, *60*(1), 2639. https://doi.org/10.4081/ejh.2016.2639

Mc-Caughey-Espinoza, D., Reyes-Olivas, Á., Ayala-Astorga, G., Lugo-García, G., Ochoa-Meza, A., & Pacheco-Olvera, A. (2020). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis en explantes de *Krameria erecta* Willd. *Abanico Agroforestal*, *2*(0), Article 0.

Menzel, W., Knierim, D., Margaria, P., Winter, S., Entrop, A. p., Stremer, P., & Heupel, M. (2021). First report of Blueberry mosaic associated virus associated with mosaic symptoms of blueberry in Germany. *New Disease Reports*, *44*(2), Article 2. https://doi.org/10.1002/ndr2.12051

Mondal, S., Ahirwar, M. K., Singh, M. K., & Singh, R. P. (2015). *EFFECT OF COCONUT WATER AND ASCORBIC ACID ON SHOOT REGENERATION IN BANANA VARIETY DWARF CAVENDISH*.

Nhut, D. T., Tam, D. T. T., Luan, V. Q., Hien, N. T. T., & Tung, H. T. (2022). A Protocol of Shoot Regeneration and Polyploid Plantlet Production in Paphiopedilum villosum. En D. T. Nhut, H. T. Tung, & E. C.-T. YEUNG (Eds.), *Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region* (pp. 327–342). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-16-6498-4_16

Omori, M., Yamane, H., & Tao, R. (2024). Comparative transcriptome and functional analyses provide insights into the key factors regulating shoot regeneration in highbush blueberry. *Horticulture Research*, *11*(6), uhae114. https://doi.org/10.1093/hr/uhae114

Phillips, D., Williamson, J., Olmstead, J., & Lyrene, P. (2020). Reproductive Growth and Development of Blueberry. *EDIS*, *2020*(2), Article 2. https://doi.org/10.32473/edis-hs220-2020

Pinochet, D., Artacho, P., & Maraboli, A. (2014). *MANUAL DE FERTILIZACION DE ARANDANOS CULTIVADOS EN EL SUR DE CHILE*.

Pritts, M. P., Hancock, J. F., Strik, B., Eames-Sheavly, M., & Celentano, D. (1992). *Highbush Blueberry Production Guide*. Northeast Regional Agricultural Engineering Service (NRAES). https://hdl.handle.net/1813/66931

Raikar, S. V., Isak, I., Patel, S., Newson, H. L., & Hill, S. J. (2024). Establishment of feijoa (Acca sellowiana) callus and cell suspension cultures and identification of arctigenin—A high value bioactive compound. *Frontiers in Plant Science*, *14*. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1281733

Retamales, J. B., & Hancock, J. F. (2018). *Blueberries*. CABI.

Rodríguez Beraud, M. M., Latsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, *35*(1), 21–22. https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011

Schuchovski, C., Sant'Anna-Santos, B. F., Marra, R. C., & Biasi, L. A. (2020). Morphological and anatomical insights into de novo shoot organogenesis of *in vitro* 'Delite' rabbiteye blueberries. *Heliyon*, *6*(11). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05468

Soto-Caro, A., Wu, F., Xia, T., & Guan, Z. (2023). Demand analysis with structural changes: Model and application to the US blueberry market. *Agribusiness*, *39*(4), 1100–1116. https://doi.org/10.1002/agr.21815

Souza, D. M. S. C., Fernandes, S. B., Molinari, L. V., Avelar, M. L. M., & Brondani, G. E. (2021). ACTIVATED CHARCOAL APPLICATION FOR THE MICROPROPAGATION OF *Cattleya*

crispata (Thunb.) Van den Berg. *Nativa*, *9*(4), Article 4. https://doi.org/10.31413/nativa.v9i4.12164

Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, *26*(6), 618–631. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.003

Tuesta, O. G., & Chico-Ruiz, J. (2016). Callos embriogénicos inducidos "Palto" con diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento. *Sagasteguiana*, *4*(1), Article 1.

Undurraga D., P., & Vargas S., S. (2013). *Manual del arándano*. https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/7627

Van Staden, J., Fennell, C. W., & Taylor, N. J. (2006). PLANT STRESS *IN VITRO*: THE ROLE OF PHYTOHORMONES. *Acta Horticulturae*, *725*, 55–62. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.725.2

von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *69*(3), 233–249. https://doi.org/10.1023/A:1015673200621

Wang, Y., Dong, X., Huang, H.-Y., & Wang, Y.-Z. (2019). Establishment of efficient adventitious shoots induction system and ex vitro rooting in *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae). *Botanical Sciences*, *97*(2), Article 2. https://doi.org/10.17129/botsci.2135

Weber, C. (2024). *Fruit and Tree Nuts Outlook: March 2024*.

Yeh, D. A., Kramer, J., Calvin, L., & Weber, C. (2023). *The Changing Landscape of U.S. Strawberry and Blueberry Markets: Production, Trade, and Challenges from 2000 to 2020*.

Zawawi, D. D., Bakar, M. F. A., & Kadir, S. N. A. (2021). Effect of 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid and Activated Charcoal on Callus Induction of *Cocos Nucifera L*. Hybrid MATAG Inflorescence. *Journal Of Agrobiotechnology*, *12*(1S), Article 1S. https://doi.org/10.37231/jab.2021.12.1S.270

Zhang, Y., Kan, J., Liu, X., Song, F., Zhu, K., Li, N., & Zhang, Y. (2024). Chemical Components, Nutritional Value, Volatile Organic Compounds and Biological Activities *In Vitro* of Coconut

(*Cocos nucifera L.*) Water with Different Maturities. *Foods*, *13*(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/foods13060863

Zhao, X., Zhan, L., & Zou, X. (2011). *In vitro* high-frequency regeneration of half-highbush 'Northland' blueberry. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, *39*(1), 51–59. https://doi.org/10.1080/01140671.2010.524188

Zhou, Y., Li, Q., Wang, Z., & Zhang, Y. (2023). High Efficiency Regeneration System from Blueberry Leaves and Stems. *Life*, *13*(1), Article 1. https://doi.org/10.3390/life13010242

ANEXOS

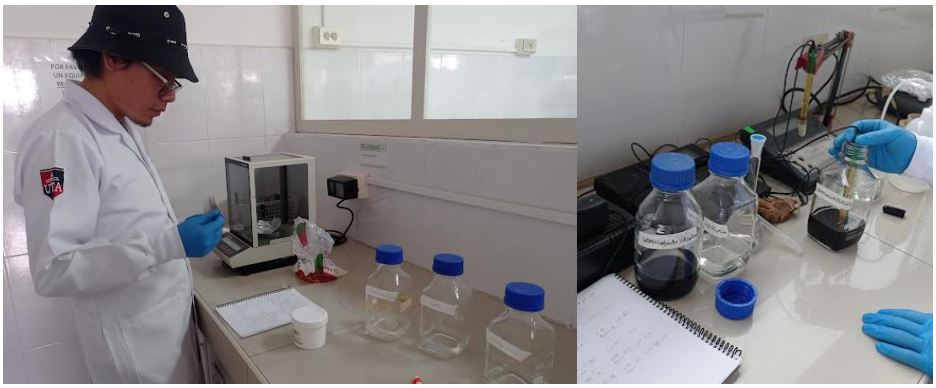


Figura 20. Preparación de medios de cultivo



Figura 21. Recolección del material vegetal



Figura 22. Desinfección del material vegetal:

A. Inmersión en agua con jabón**, B.** Inmersión en fungicidas (Carbemex y Phyton)**, C.** Inmersión en alcohol en la cámara de flujo**, D.** Inmersión en cloro en la cámara de flujo.

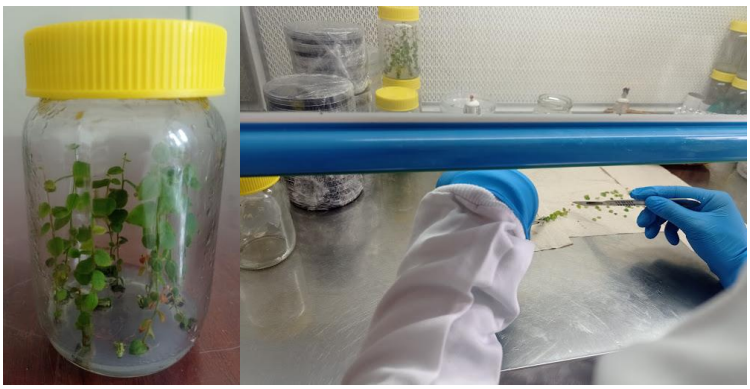


Figura 23. Extracción de las hojas *in vitro*



Figura 24. Siembra del material vegetal



Figura 25. Callos obtenidos en dos tipos de explantes



Figura 26. Pesaje de los callos obtenidos



Figura 27. Tinción

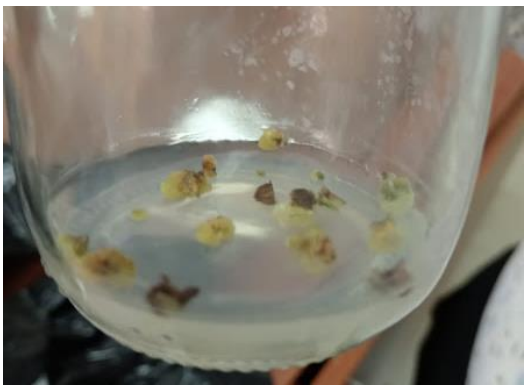


Figura 28. Subcultivo de callos

Anexo 1. Composición del Medio Woody Plant Medium (WPM)

Tabla 8.

Descripción de los macronutrientes, micronutrientes y componentes orgánicos para un litro (L) del medio WPM

Macronutrientes		Vitaminas	
NH_4NO_3	400 mg/L	Tiamina HCl	1,6 mg/L
Ca (NO_3) $4H_2O$	550 mg/L	Acido nicotínico	0,5 mg/L
K_2 SO_4	990 mg/L	Mio-Inositol	100 mg/L
KH_2 PO_4	170 mg/L		
$CaCl_2$ $2H_2O$	96 mg/L	**Hierro**	
$MgSO_4$ $7H_2O$	370 mg/L	$FeSo_4$ $7H_2O$	27,8 mg/L
Micronutrientes		Na_2EDTA $2H_2O$	37,3 mg/L
H_3BO_3	6,2 mg/L		
$MnSO_4$ $4H_2O$	22,3 mg/L	**Otros**	
$ZnSO_4$ $7H_2O$	8,6 mg/L	Sucralosa	25 g/L
Na_2MoO_4 $2H_2O$	0,25 mg/L	**pH**	
$CuSo_4$ $5H_2O$	0,25 mg/L	5,2 ± 2	

Fuente: (G. C. Phillips & Garda, 2019)

Anexo 2. Análisis estadístico de la tasa de inducción de callos por hojas

Variable dependiente: % Inducción

Factor: Medios

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla 9.

ANOVA para % Inducción por Medios en hojas

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón -F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,56	2	0,28	5,7273	0,02486

Intra grupos	0,44	9	0,0489
Total (Corr.)	1	11	

Tabla 10.

Prueba post hoc

Pruebas de Múltiple Rangos para Inducción por Medios en hojas

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
2	4	0,5	A
3	4	0	B
1	4	0,4	AB

Aquellas letras que forman parte de la misma columna no hay diferencias estadísticamente significativas.

Anexo 2. Análisis estadístico de la tasa de inducción de callos por flores

Variable dependiente: % Inducción

Factor: Medios

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla 11.

ANOVA para % Inducción por Medios en flores

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón -F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,18	2	0,09	2,6129	0,1274
Intra grupos	0,31	9	0,03444		
Total (Corr.)	0,49	11			

Tabla 12.

Prueba post hoc

Pruebas de Múltiple Rangos para Inducción por Medios en flores

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
2	4	0,5	B
3	4	0	A
1	4	0,4	A

Aquellas letras que forman parte de la misma columna no hay diferencias estadísticamente significativas.

Anexo 3. Análisis estadístico bifactorial de la tasa de inducción de callos por hojas

Variable dependiente: % Inducción

Factor1: Medio de cultivo

Factor2: Hormonas

Número de observaciones: 48

Tabla 13.

ANOVA para % Inducción por Medios en hojas

Factores	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón - F*	*Valor-P*
Medio	2,6600	2	1,3300	47,88	7,2e-11 ***
Hormona	1,2467	3	0,4156	14,96	1,75e-06 ***
Interacción	0,6133	6	0,1022	3,68	0,0059**
Error	1,000	36	0,0278		

*El asterisco (*) indica el nivel de significancia estadística de los factores y las interacciones en el modelo. Siendo ***: Nivel de significancia extremadamente alto y **: Nivel de significancia muy alta.*

Tabla 14.

Prueba post hoc

Pruebas de Múltiple Rangos para Inducción por Medios en hojas

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	***Casos***	***Media***	***Grupos Homogéneos***
1	4	0,25	BCD
2	4	0,60	AB
3	4	0,95	A
4	4	1	A
5	4	0,1	CD
6	4	0	D
7	4	0,2	BCD
8	4	0,2	BCD
9	4	0,15	CD
10	4	0,4	BCD
11	4	0,5	BC
12	4	0,45	BC

Aquellas letras que forman parte de la misma columna no hay diferencias estadísticamente significativas.

Anexo 4. Análisis estadístico bifactorial de la tasa de inducción de callos por flores

Variable dependiente: % Inducción

Factor1: Medio de cultivo

Factor2: Hormonas

Número de observaciones: 48

Tabla 15.

ANOVA para % Inducción por Medios en flores

Factores	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón -F*	*Valor-P*
Medio	150	2	75.0	0.201	0.8184
Hormona	1667	3	555.6	1.493	0.2330
Interacción	4383	6	730.6	1.963	0.0971
Error	13400	36	372.2		

Tabla 16.

Prueba post hoc

Pruebas de Múltiple Rangos para Inducción por Medios en flores

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
1	4	0,7	A
2	4	0,75	A
3	4	0,6	A
4	4	0,6	A
5	4	0,7	A
6	4	0,35	A
7	4	0,65	A
8	4	0,65	A
9	4	0,75	A
10	4	0,65	A
11	4	0,7	A
12	4	0,55	A

Aquellas letras que forman parte de la misma columna no hay diferencias estadísticamente significativas.

Anexo 5. Graficas del color y consistencia de callo obtenido por flores

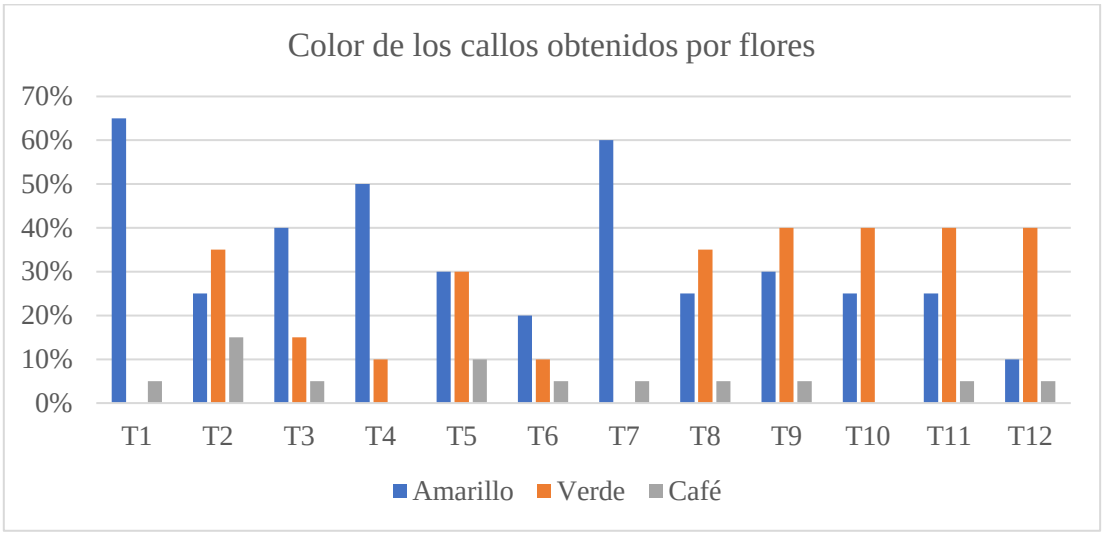


Figura 29. Color de los callos obtenidos por flores

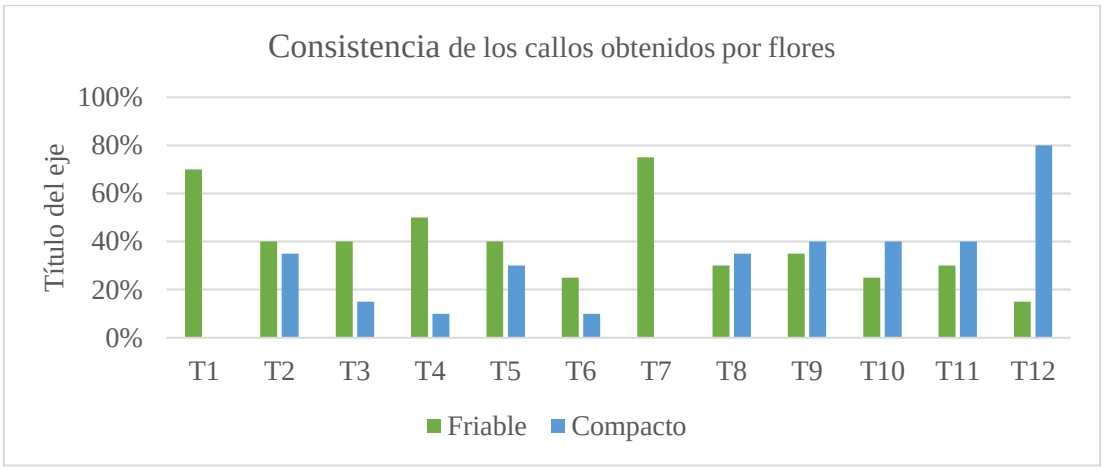


Figura 30. Consistencia de los callos obtenidos por flores

Anexo 6. Graficas del color y consistencia de callo obtenido por hojas

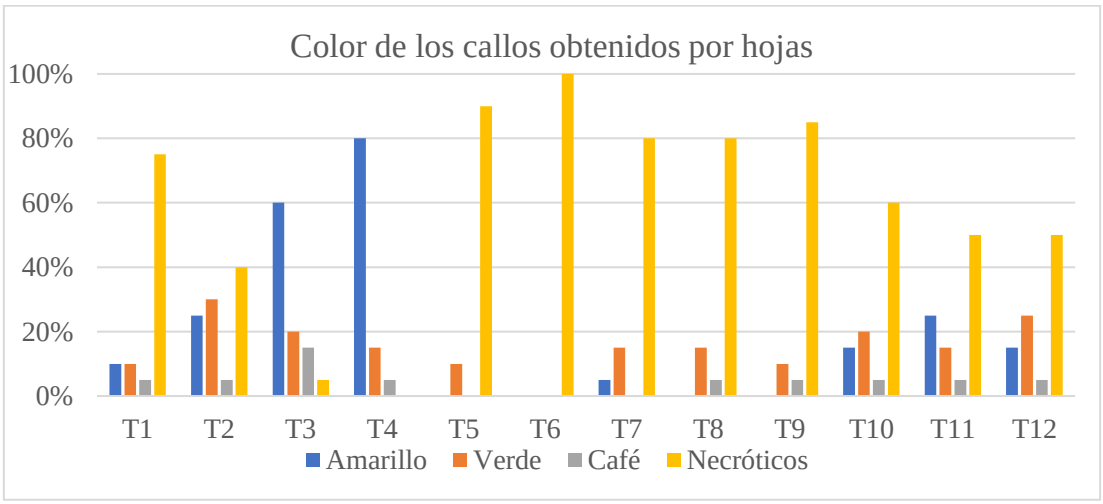


Figura 31. Color de los callos obtenidos por hojas

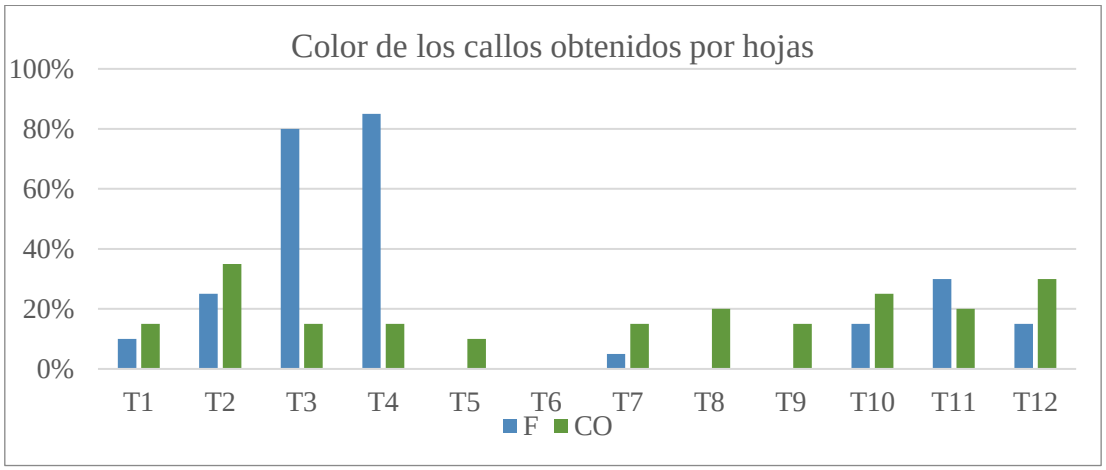


Figura 32. Consistencia de los callos obtenidos por hojas