**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

---

# Optimización del proceso de enraizamiento *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivar Biloxi

---

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

**Autoras:** Mary Gissela Guamán Chito

Yadira Michelle Tubón Pilatasi

**Tutor**: Mg. Manoella Alejandra Sánchez Garnica

**Ambato – Ecuador**

**Agosto - 2024**

## APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. Manoella Alejandra Sánchez Garnica

**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, 19 de junio de 2024

Firmado electrónicamente por:
MANOELLA ALEJANDRA SANCHEZ GARNICA

---

Mg. Manoella Alejandra Sánchez Garnica

0604079871

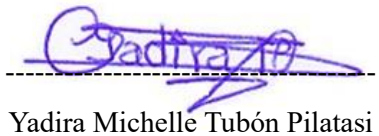
**TUTOR**

## AUTORÍA DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Mary Gissela Guamán Chito y Yadira Michelle Tubón Pilatasi, 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 Ingenieras Biotecnólogas, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Mary Gissela Guamán Chito
1851009736
**AUTOR**



Yadira Michelle Tubón Pilatasi
1805099064
**AUTOR**

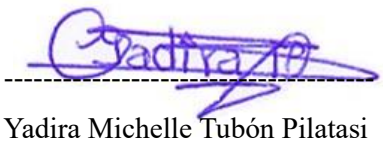
**DERECHOS DE AUTOR**

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 nuestro Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además aprobamos 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.



Mary Gissela Guamán Chito
1851009736
**AUTOR**



Yadira Michelle Tubón Pilatasi
1805099064
**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 en Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
LILIANA ALEXANDRA CERDA MEJIA

**Presidente del Tribunal**

Firmado electrónicamente por:
DANAE FERNANDEZ RIVERO

**Mg. Danae Fernández Rivero**

**1757181209**

Firmado electrónicamente por:
PABLO VINICIO TUZA ALVARADO

**Dr. Pablo Vinicio Tuza Alvarado**

**1104063241**

Ambato, 2 de agosto de 2024

## DEDICATORIA

*A Dios, fuente de sabiduría y guía, agradezco por brindarme la fuerza necesaria en los momentos difíciles y por iluminar mi camino hacia el éxito. Todo lo logrado es gracias a ti.*

*A mis amados padres, Rosa Pilatasi y Oswaldo Tubón, este logro que alcanzo es un reflejo claro de su amor incondicional y la guía constante que siempre me han brindado. Han sido mis pilares de fortaleza y confianza a lo largo de mi camino, especialmente en los momentos más difíciles. Agradezco de corazón el inquebrantable esfuerzo y sacrificio que han dedicado a mi educación, así como por creer en mí y apoyarme en cada etapa de mi desarrollo académico y personal.*

*A mi querida hermana Gissela, quien siempre ha estado a mi lado brindándome apoyo y aliento para seguir adelante sin rendirme. Tu constante motivación y ejemplo han sido fundamentales en mi vida. Agradezco profundamente que estés siempre a mí lado, inspirándome a superarme cada día.*

*A mis dos ángeles Aníbal y Margarita, aunque ya no estén físicamente conmigo, sus espíritus y amor perduran en cada página de esta tesis. Son mi eterna inspiración y fortaleza. Dedico este logro con profundo amor y gratitud a cada uno de ustedes, quienes dejaron una huella imborrable en mi vida. Fueron ustedes quienes me enseñaron el valor del esfuerzo y la perseverancia, enseñanzas que llevaré siempre conmigo.*

*Esta tesis no solo representa mi dedicación personal, sino también la red de amor y apoyo que he tenido a mi alrededor. En cada desafío y logro, he sentido de manera tangible su influencia, la cual me ha motivado a superar obstáculos y alcanzar metas. Agradezco a todos quienes han sido parte de este camino por inspirarme a ser la mejor versión de mí misma.*

***Yadira Michelle Tubón Pilatasi***

## DEDICATORIA

*A mi Dios, que es principio y fin de todo lo creado, fuente de inspiración y sabiduría, que ha guiado mis pasos en este camino de conocimiento y descubrimiento. Gracias por iluminar mi mente y fortalecer mi voluntad.*

*A Santa María, madre de Cristo y nuestra, por su mirada maternal sobre mí, que me ha guiado durante la búsqueda de conocimiento. En este trabajo, deposito mi esfuerzo humano como ofrenda, como un Rosario tejido con gratitud y devoción. A ti, Santa María, dedico estas páginas, y que mi búsqueda de sabiduría sea un tributo hacia ti.*

*A mis padres, Carlos Guamán y Flor Chito, cuyos esfuerzos, sacrificios, paciencia y amor incondicional han sido mi motor para seguir adelante. Vuestra confianza en mí me impulsa a alcanzar nuevas metas. Sin ustedes, nada de esto sería posible.*

*A ti, Padre Amado, mi guía en los senderos de risas y lágrimas de esta historia llamada vida. Desde muy pequeña, fuiste mi gran ejemplo a seguir, mi fuente de motivación. Tus palabras han sido lecciones valiosas; atesoro tu sabiduría en mi corazón, y cada consejo tuyo resuena en mi mente. Infinitas gracias por haberme enseñado a no rendirme por más adversa que se encuentre la situación, por ser mi eterno cómplice. Tu amor puro y sincero me ha fortificado como ser humano.*

*A mi bella madre, por su apoyo incondicional, por haberme guiado con ternura y por tejer con amor los hilos de mi vida, infinitas gracias. Me enseñaste a ser firme en mis objetivos, a luchar con valentía y a abrazar cada desafío. Tu amor es mi refugio, y en cada paso que doy, siento tu presencia y tu aliento.*

*A ambos, les dedico estas páginas, donde mi búsqueda de sabiduría se convierte en un canto de gratitud hacia ustedes. Que este trabajo sea un tributo a su amor inquebrantable y a la luz que han derramado sobre mi camino.*

*A mi querida Tía Narcisa, quien fue mi refugio durante la ausencia de mis padres. Su cálida presencia, sus cuidados y su paciencia hacia mí, como si fuera su hija propia, me recordaron que no estaba sola en este viaje académico. Estas muestras de cariño y apoyo me alentaron a dar cumplimiento con mi cometido. A ti, mi Tía Nashi, dedico este trabajo con gratitud y afecto sincero.*

*Al Ingeniero Julio Sosa, infinitas gracias por impulsarme a dar mi mejor esfuerzo y por creer en que sí podía. ¡Dios le conceda bendiciones y siempre sea un rayito de luz para las personas! Gracias a usted, continué en esta batalla llamada universidad. Usted es el fiel ejemplo de que una palabra puede cambiar el rumbo de una persona y en mi caso me redireccionó y fortificó.*

***Mary Gissela Guamán Chito***

## AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer sinceramente a todas las personas que han sido esenciales en la elaboración de esta tesis. Este proyecto no solo refleja mi dedicación personal, sino también al invaluable conjunto de apoyo y afecto.

- **A mi querida Universidad:** agradezco a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato por haberme brindado la invaluable oportunidad de formarme académicamente en sus reconocidas instalaciones. El acceso a sus prestigiosas aulas y la calidad educativa impartida por sus destacados profesores han sido fundamentales para mi desarrollo profesional.
- **A mi tutora, Mg. Alejandra Sánchez:** quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutora, por su profundo compromiso, guía y orientación durante todo el proceso de elaboración de esta tesis. Sus conocimientos expertos, paciencia y apoyo constante fueron fundamentales para alcanzar los objetivos de este trabajo.
- **A Mary:** mi compañera de trabajo, gracias por el apoyo mutuo que hemos compartido durante la culminación de este proyecto. Tu colaboración y compromiso fueron fundamentales para enfrentar los desafíos y lograr nuestros objetivos en conjunto.

*Yadira Michelle Tubón Pilatasi*

## AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi profunda gratitud a todos aquellos que contribuyeron al cumplimiento exitoso de mi trabajo de titulación. A continuación, deseo reconocer a quienes han dejado una huella imborrable en mi camino académico:

- **A mi querida Universidad**: Gracias por abrirme las puertas para superarme. A todas sus autoridades y maestros, quienes me impartieron sus conocimientos tanto en las aulas como fuera de ellas, les estoy profundamente agradecido.
- **A mi tutora, Mg. Alejandra Sánchez**: Un agradecimiento sincero por su paciencia, instrucciones, enseñanzas y apoyo. Pero, sobre todo, por su amistad.
- **A Michelle, mi colega**: Tu esfuerzo, responsabilidad y sabiduría han sido fundamentales en el desarrollo de este, nuestro trabajo. Gracias por tu labor incansable.
- **A Raquel, Saul y Michelle**: Por su amistad y los buenos momentos compartidos durante el proceso de formación en las aulas. Espero que nuestros caminos sigan entrelazándose, como un árbol que busca el cielo, y que, en cada estación, florezcan nuevos versos. Porque la amistad es el poema más hermoso que escribimos juntos. ¡Gracias y larga vida a todos!

*Mary Gissela Guamán Chito*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

**APROBACIÓN DEL TUTOR**……..ii
**AUTORÍA DE TRABAJO DE TITULACIÓN**……..iii
**DERECHOS DE AUTOR**……iv
**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**……v
**DEDICATORIA**……vi
**DEDICATORIA**……...vii
**AGRADECIMIENTO**……viii
**AGRADECIMIENTO**……..ix
**ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS**……x
**ÍNDICE DE TABLAS**…….xii
**ÍNDICE DE FIGURAS**……...xii
**RESUMEN EJECUTIVO**……..xiii
**ABSTRACT**…….xiv
**CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO**……...1
1.1 Antecedentes investigativos ..... 1
1.1.1Arándanos y la importancia económica ..... 2
1.1.1.1 Arándano (*V. corymbosum* L.) cultivar Biloxi..... 3
1.1.2Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales..... 6
1.1.2.1 Importancia y aplicaciones de cultivo in vitro ..... 7
1.1.2.2 Organogénesis..... 7
1.1.2.3 Enraizamiento ..... 8
1.1.2.4 Beneficio del enraizamiento in vitro..... 9
1.1.2.5Tratamiento de material vegetal para cultivo *in vitro* ..... 10
1.2 Objetivos..... 16
Objetivo General..... 16
Objetivos Específicos..... 16
**CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA**……17
2.1 Métodos..... 17
2.2 Análisis del tratamiento más eficiente de desinfección vegetal en explantes internodales de (*V. corymbosum* L) variedad Biloxi..... 17
2.2.1 Diseño experimental ..... 17

2.2.2 Selección de los explantes óptimos de arándano Biloxi ..... 18
2.2.3 Desinfección del material vegetal fuera de la cámara ..... 19
2.2.4 Desinfección del material vegetal dentro de la cabina ..... 19
2.3 Determinación de la efectividad de los medios de cultivo Murashige-Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM) en la inducción de raíces de arándano variedad Biloxi ..... 19
2.3.1 Diseño experimental ..... 19
2.3.2 Preparación de medios de cultivo ..... 20
2.3.3 Preparación de material vegetal ..... 21
2.3.4 Siembra de explantes internodales ..... 21
2.4. Identificación de la mejor fitohormona ANA y AIB en la fase de enraizamiento *in vitro* de los explantes de arándano variedad Biloxi. ..... 21
2.4.1 Diseño experimental ..... 21
2.4.2 Preparación de medios de cultivos combinado con fitohormonas ácido Indolbutírico (AIB) y ácido naftalenacético (ANA) ..... 22
2.4.3 Preparación del material vegetal ..... 22
2.4.4 Siembra de explantes ..... 23
**CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**..... 24
3.1 Desinfección de explantes internodales de *Vaccinium corymbosum L. cultivar Biloxi* ..... 24
3.1.1 Contaminación ..... 24
3.1.2 Oxidación y viabilidad ..... 26
3.2 Medios de cultivo efectivos para la estimulación celular de explantes de *Vaccinium corymbosum* L. cultivar Biloxi ..... 29
3.3 Fitohormonas ANA y AIB como inductores de enraizamiento de explantes de *Vaccinium corymbosum* L. cultivar Biloxi ..... 34
**CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**..... 39
4.1 Conclusiones..... 39
4.2 Recomendaciones ..... 39
Bibliografía ..... 40
Anexos ..... 52

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Composición nutricional del arándano ..... 3
**Tabla 2.** Composición de los tratamientos de desinfección ..... 18
**Tabla 3.** Condiciones de tratamientos ..... 20
**Tabla 4.** Condiciones de tratamientos ..... 22
**Tabla 5.** Porcentajes de contaminación, oxidación y viabilidad de explantes de *Vaccinium corymbosum* L. cultivar Biloxi bajo dos tratamientos de desinfección ..... 24
**Tabla 6.** Número de hojas y longitud del brote en los explantes de Vaccinium corymbosum L. cultivar Biloxi en el transcurso de la segunda, cuarta y sexta semana ..... 29
**Tabla 7.** Porcentajes de enraizamiento de los diferentes tratamientos biológicos ..... 35

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Porcentaje contaminación de explante de Vaccinium corymbosum L. cultivar Biloxi con diferentes tratamientos de desinfección ..... 25
**Figura 2.** Tratamientos con hipoclorito de sodio 2% ..... 26
**Figura 3.** Porcentaje de oxidación y viabilidad de explantes de *Vaccinium corymbosum* L. cultivar Biloxi con dos tratamientos de desinfección ..... 27
**Figura 4.** Tratamientos con medio de cultivo WPM (Tercera Semana) ..... 30
**Figura 5.** Tratamientos con medio de cultivo MS (Tercera semana) ..... 30
**Figura 6.** Desarrollo de hojas y altura de los brotes en los diferentes tratamientos biológicos a la segunda semana, cuarta semana y sexta semana después de la siembra de explantes ..... 31
**Figura 7.** Desarrollo de hojas y longitud de brotes en los diferentes tratamientos biológicos a la sexta semana después de la siembra de explantes ..... 33
**Figura 8.** Porcentaje de enraizamiento de arándano Biloxi en diferentes tratamientos biológicos ..... 37
**Figura 9.** Raíces desarrolladas de los explantes de arándanos ..... 37
**Figura 10.** Gráficas de interacción entre tratamientos de desinfección, medios de cultivo y fitohormonas ..... 38

## RESUMEN EJECUTIVO

El arándano ha ganado popularidad por los beneficios para la salud. Ecuador, con mayor cantidad de horas de luz solar y sin zonas horarias, es un entorno propicio para potenciar y expandir estos cultivos. Sin embargo, existen obstáculos significativos: la limitada y costosa disponibilidad de material vegetal. Este problema se origina debido a que la propagación convencional no puede hacer frente a la demanda de plantas, debido al difícil enraizamiento de los explantes causado por el estrés físico y fisiológico. Ante esta situación, la micropropagación vegetal emerge como una solución viable. Esta técnica permite la obtención de plántulas a gran escala, superando las limitaciones de la propagación convencional. Por ello, la presente investigación busca optimizar el proceso de enraizamiento *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedad Biloxi. Para lograrlo, evaluaremos tratamientos de desinfección, medios de cultivo y fitohormonas. El objetivo es facilitar el establecimiento *ex vitro* y satisfacer la creciente demanda de plantas. El mejor tratamiento de desinfección utilizó hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2 por ciento por 15 minutos. Bajo estas condiciones, se logró un 9 por ciento de contaminación, una viabilidad del 91 por ciento y una oxidación del 7 por ciento. Además, tratamientos con medio de cultivo WPM arrojaron mejores resultados, con un promedio de 8 hojas y una longitud de brotes de 1,409 cm. Además, se evidenció un 84 por ciento de enraizamiento con una longitud promedio de raíces de 3,24 cm y 11,76 raíces por explante utilizando 1,5 mg sobre L de la fitohormona AIB.



**Palabras clave:** Micropropagación, cultivo *in vitro*, arándanos, enraizamiento.

**ABSTRACT**

Blueberries have gained popularity owing to their health benefits. Ecuador, with more hours of sunlight and the absence of time zones, offers a favorable environment for enhancing and expanding these crops. However, there are significant obstacles to the limited and expensive availability of plant materials. This problem arises because conventional propagation cannot cope with the demand for plants owing to the difficult rooting of explants caused by physical and physiological stress. In this context, plant micropropagation is a viable solution. This technique allows large-scale seedlings to be obtained from cuttings, thereby overcoming the limitations of conventional propagation. Therefore, this research aims to optimize the *in vitro* rooting process of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Biloxi variety. To achieve this, we will evaluate disinfection treatments, culture media, and phytohormone levels. The objective was to facilitate *ex vitro* establishment and meet the growing demand for plants. The best disinfection treatment was 2 percent sodium hypochlorite (NaOCl) for 15 min. Under these conditions, 9 percent contamination, 91 percent viability, and 7 percent oxidation were observed. In addition, treatments with WPM yielded better results, with an average of eight leaves and a shoot length of 1,409 cm. In addition, 84 percent rooting was evident, with an average root length of 3,24 cm and 11,76 roots per explant using 1,5 mg per L of the phytohormone AIB.

**Keywords:** Micropropagation, *in vitro* culture, blueberries, rooting.

## CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes investigativos

A nivel mundial, el arándano es reconocido como uno de los alimentos con múltiples beneficios para la salud. En el contexto nacional, este cultivo presenta una alta proyección productiva y comercial **(Lobos & Hancock, 2015).** Ecuador se destaca como un país con un gran potencial para la inversión en la agroexportación del arándano en el mercado internacional, debido a su mayor cantidad de horas de luz y la ausencia de zonas horarias, lo que permite una producción continua de frutos durante todo el año **(La Hora, 2023).** Además, las condiciones climáticas son ideales para su adecuado desarrollo; la altitud ecuatorial facilita un amplio rango de temperaturas, con un promedio anual que oscila entre 0 y 26°C. En la región Andina, el clima es diverso debido a la Cordillera de los Andes y los vientos que circulan por valles y llanuras **(Mihai *et al*., 2023).**

Organismos como el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y la Federación Ecuatoriana de Productores y Exportadores de Arándano (FEPEXA) están promoviendo activamente la cadena productiva del arándano, un fruto que se está posicionando como un cultivo estratégico en el ámbito agroexportador del país **(AGROCALIDAD, 2022).** Entre los beneficios de esta emergente industria se incluyen la diversificación de las exportaciones ecuatorianas, lo cual contribuye a reducir la dependencia económica del país en unos pocos productos tradicionales. Asimismo, se está fomentando la creación de empleo en la región Sierra, lo que ayuda a combatir el desempleo rural y a mejorar las condiciones de vida de las comunidades locales. Además, el incremento en la generación de divisas fortalece la posición financiera de Ecuador en el mercado global **(FEPEXA, 2021).** Sin embargo, las estrictas regulaciones y normativas del país en cuanto a sanidad vegetal y control fitosanitario han resultado en una baja tasa de importación de plantas, lo cual representa un desafío significativo para la producción a gran escala de arándanos.

Durante el año 2022, Ecuador exportó 161500 kg de arándanos a destinos como los Países Bajos, Alemania y Singapur, según datos de **AGROCALIDAD (2022).** Aunque la comercialización del producto es rentable, se enfrenta al desafío de una considerable inversión inicial, aproximadamente 120000 dólares por hectárea de cultivo. Este costo se atribuye principalmente a la adquisición de material vegetal y al proceso de producción agrícola **(Vinueza, 2023).** La importación del material vegetal de arándano no es una alternativa; de acuerdo con la **Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAOLEX] (2019),** el país presenta restricciones para importar material vegetal por sus posibles plagas cuarentenarias de alto riesgo fitosanitario que amenazan la biodiversidad nativa y endémica. En cuanto al proceso de producción, su elevada inversión se debe a la arquitectura radicular del arándano, que demanda condiciones específicas para un adecuado

enraizamiento en el suelo. Por lo tanto, la propagación vegetal emerge como una solución viable, permitiendo la obtención masiva de plantas libres de patógenos en un tiempo reducido, manteniendo la pureza genética y asegurando una alta capacidad de enraizamiento **(Santos et al., 2024).**

Las investigaciones biotecnológicas referentes a la micropropagación *in vitro* representan una fuente confiable para la multiplicación de especies vegetales con fines comerciales, garantizando uniformidad genética y rendimiento de producción **(Llivisaca et al., 2020).** Considerando los antecedentes mencionados la presente investigación tiene como finalidad la obtención de un mayor número de plantas de arándano (*V. corymbosum* L.) variedad Biloxi mediante micropropagación *in vitro* evaluando métodos de desinfección, medios de cultivo y fitohormonas.

### 1.1.1 Arándanos y la importancia económica

Según la base de datos estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el año 2022 fue testigo de un logro extraordinario en el ámbito agrícola. Se registró una producción que no solo cumplió con las expectativas de volumen, sino que también superó los umbrales financieros, generando ingresos que excedieron los 2 millones de dólares. Este notable éxito económico, detallado en **FAOSTAT (2022)**, es un claro indicador del dinamismo y la importancia del sector agrícola en la economía mundial. En el año 2021, América del Norte alcanzó una producción de más de 1 millón de toneladas de arándanos, equivalente al 80% de la producción global, situando a Estados Unidos como el líder indiscutible en producción. Según datos de la FAO, se estima que hasta el año 2030 la producción mundial de arándanos podría alcanzar un valor de 1,08 ± 0,26 millones de toneladas **(Martău et al., 2023).**

Entre las especies de arándanos con mayor valor económico destacan el arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*), conocido por su intenso sabor y propiedades antioxidantes; el arándano azul (*Vaccinium caesariense*), apreciado por su dulzura y versatilidad; el arándano negro (*Vaccinium myrtillus*), valorado por su concentración de nutrientes; y el arándano rojo europeo (*Vaccinium parvifolium*), que se distingue por su adaptabilidad a diversos climas **(Martău et al., 2023).** Estas variedades no solo enriquecen la biodiversidad, sino que también fortalecen la economía de las regiones donde se cultivan. En América del Sur, países como Argentina, cultivan la especie *V.corymbosum* (highbush) y *V.ashei* (rabbiteye), el 90% de su producción está destinado a la exportación del fruto a países como Reino Unido y Estados Unidos, aprovechando los beneficios de la contrastación en los meses de septiembre a mayo **(Rivas et al., 2019).** En Ecuador, debido a que no presenta las estaciones del año marcadas tiene la ventaja de producir los frutos durante los 12 meses del año **(La Hora, 2023).**

En un período de apenas dos años, de 2020 a 2022, Ecuador experimentó un crecimiento exponencial en su sector exportador de arándanos, pasando de modestos 300 kilogramos a impresionantes 145 toneladas enviadas a los Países Bajos, según reportes de **La Hora (2023).** Este notable incremento no solo subraya la creciente eficiencia y capacidad de producción del país, sino también la elevada demanda internacional por este preciado fruto. Según la Federación de Productores y Exportadores de Arándanos (Fepexa), en Ecuador, para el año 2021, existían cincuenta hectáreas en producción, una cantidad insuficiente para satisfacer la demanda local **(Mora et al., 2023).** La producción de arándanos en Ecuador se concentra principalmente en las provincias de Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Pichincha, Azuay y Tungurahua, seleccionadas por las condiciones de suelo y el clima favorable para el cultivo **(Mora et al., 2023).**

#### 1.1.1.1 Arándano (*V. corymbosum* L.) cultivar Biloxi

El arándano, conocido como el "rey de las bayas" **(Yang et al., 2022)**, es miembro de la familia Ericaceae, que comprende más de 125 géneros. Dentro de esta familia destaca el género Vaccinium, conocido por su amplia diversidad con 4230 especies repartidas en 9 subfamilias, presentes en regiones como Europa, África Sudoriental y Central, así como América del Norte y Central **(Martău et al., 2023).** El arándano (V. *corymbosum L.)* es un arbusto perenne de crecimiento bajo que alcanza entre 35 y 60 centímetros de altura. Sus hojas son caducas y produce frutos esferoidales y carnosos, de color azul o negro intenso, con un diámetro máximo de 5 a 9 milímetros. Este fruto es reconocido por su equilibrado sabor agridulce y su rico valor nutricional, destacándose por su alto contenido nutricional **(Martău et al., 2023).**

**Tabla 1.**
Composición nutricional del arándano.

| Elemento | Cantidad |
|---|---|
| Agua | 84,0 % |
| Hidratos de carbono | 9,7 % |
| Proteínas | 0,6 % |
| Grasas | 0,4 % |
| Fibras | 3,0 – 5,0 % |

**Nota:** Datos tomados del estudio de **Rashwan y colaboradores, (2023).**

Además, se estima que el aporte energético es de 192 kJ/100 g **(Rashwan et al., 2023).** Las antocianinas, presentes en los frutos y hojas, se encuentran en un rango de 0,1% a 0,25% **(Martău et**

**al., 2023)**. Esta fuente de compuestos, como las antocianinas, flavonoides, fenólicos y vitamina C, son influenciados significativamente por la especie y la variedad de arándano. En particular, el arándano del cultivar Biloxi se distingue por su alto contenido de compuestos fenólicos, especialmente antocianinas **(González et al., 2021)**. Este perfil nutricional no solo contribuye al sabor y valor antioxidante de los arándanos, sino que también los hace destacar como una opción nutritiva y beneficiosa para la salud.

El contenido de compuestos fenólicos en la parte aérea de las plantas está influenciado por diversos factores como el genotipo, las condiciones de desarrollo (temperatura, nutrientes del suelo, latitud y altitud de crecimiento) y la madurez de la planta **(Bujor et al., 2019)**. En cuanto a los frutos, contienen una combinación de más de 20 antocianinas, compuestas por una aglicona y azúcares **(Martău et al., 2023)**. Estos pigmentos, que van desde tonos azules y rojos hasta púrpuras, son característicos de las antocianinas y permiten distinguir la fruta tanto en su estado maduro como en el temprano **(Kalt et al., 2020).** La variabilidad en la composición de estos compuestos fenólicos no solo afecta el color y la apariencia del fruto, sino que también influye en sus propiedades antioxidantes y potencial nutricional, haciendo que los arándanos sean altamente valorados en la dieta y la industria alimentaria.

Además, los frutos de arándanos son ricos en flavonoles, siendo la quercetina el compuesto predominante, representando el 50% del contenido, seguido por la miricetina, mientras que en concentraciones trazas se encuentran la laricitrina, siringetina e isorramnetina. Además, el flavonol kaempferol se encuentra en el fruto en cantidades menores, pero es más abundante en las hojas **(Martău et al., 2023)**. Las plantas del género *Vaccinium* también son reconocidas por ser fuentes de taninos hidrolizables y condensados. En particular, la epicatequina y la catequina se encuentran en concentraciones significativas tanto en los frutos como en las hojas **(Martău et al., 2023)**. Gracias a su alto contenido de compuestos bioactivos y su potente actividad antioxidante, los arándanos se destacan como un componente recomendado en una dieta diaria equilibrada **(Varo et al., 2021)**.

Los factores edáficos, como la temperatura, la humedad, la estructura, el pH y la aeración del suelo juegan un papel importante en el control del enraizamiento de los esquejes de plantas leñosas **(Bannoud & Bellini, 2021)**. En el caso del arándano, es crucial un suelo ácido, con un rango de pH entre 4 y 5,5, para garantizar el desarrollo óptimo de la especie. Los suelos que cumplen con estas características son principalmente los forestales orgánicos, los brezales minerales montañosos y las turberas **(Yang et al., 2022).** Este factor condicionante puede limitar el crecimiento adecuado del arándano, manifestándose en síntomas como deficiencias nutricionales, inhibición del crecimiento, reducción en el rendimiento de producción y calidad del fruto **(Martău et al., 2023; Yang et al., 2022)**.

#### 1.1.1.2 Beneficios del consumo de arándano

El fruto, al poseer un alto contenido de compuestos fenólicos, exhibe un potencial intrínseco para la promoción de la salud **(González et al., 2021)**. Estos compuestos bioactivos ejercen efectos antioxidantes, antimutagénicos, antienvejecimiento y neuroprotectores, lo que contribuye a la prevención del desarrollo de múltiples enfermedades **(Nemzer et al., 2022; Varo et al., 2021).** La ingesta del fruto incrementa el poder antioxidante hidrofílico y lipofílico del plasma humano. Específicamente, las antocianinas tienen la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica y proteger el hígado y los glóbulos rojos contra el daño causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Estas especies, al interactuar con moléculas biológicas, comprometen su función, alteran sus vías metabólicas y desequilibran la homeostasis **(Silva et al., 2020; Wang et al., 2023).**

Además, el fruto posee un efecto antimutagénico debido a su capacidad de proteger el ADN contra posibles mutaciones. En estudios realizados en ratones, se ha demostrado que los extractos de arándanos son capaces de reducir las mutaciones de micronúcleos inducidas por agentes mutagénicos como el N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) y el agente 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA), gracias a la interacción de los antioxidantes presentes en los extractos del fruto con los productos reactivos de degradación de dichos agentes mutagénicos **(Silva et al., 2020).**También se ha demostrado un efecto anticancerígeno; estudios han evidenciado que las líneas celulares de carcinoma epitelioide de cuello uterino, carcinomas de mama y carcinomas estomacales (Caco-2, HT-29 y HCT-116) presentaron inhibición en su crecimiento en presencia del extracto de arándano **(Martău et al., 2023)**. Adicionalmente, se ha observado que la memoria espacial puede mejorar con una dieta que incluye estos frutos, debido a su influencia en la modulación de la neuroinflamación y la función sináptica en el área del hipocampo **(Huang et al., 2023).**

En relación con las enfermedades cardiovasculares, tanto la disfunción endotelial como el endurecimiento arterial elástico están asociados con el estrés oxidativo y la inflamación **(Martini et al., 2023).** En estudios realizados en mujeres con hipertensión en pre-etapa y etapa 1, se observó una disminución en la rigidez arterial; la presión arterial sistólica y diastólica se redujo en un 5% y 6%, respectivamente, después de 8 semanas siguiendo una dieta basada en arándanos **(Kalt et al., 2020).** Los beneficios para la salud cardiovascular se deben al efecto de los antioxidantes y antiinflamatorios que regulan los lípidos plasmáticos y mejoran la función endotelial **(Kalt *et al.,* 2020; Martini *et al.,* 2023)**. Debido a sus características potenciales, el arándano ha experimentado un aumento en la demanda, impulsando así la necesidad de incrementar su producción.

### 1.1.2 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica biotecnológica avanzada que implica el *cultivo in vitro* de células, tejidos, semillas y órganos de plantas. Este proceso se lleva a cabo en un medio de cultivo enriquecido con nutrientes esenciales, bajo condiciones de esterilidad absoluta para prevenir cualquier contaminación **(Nhut, 2022).** Los factores ambientales como la luz, temperatura, fotoperiodo y humedad son controlados meticulosamente para crear un ambiente óptimo que promueva el desarrollo vegetal. La precisión en el manejo de estas condiciones es crucial, ya que pequeñas variaciones pueden influir significativamente en el crecimiento de las plantas. Esta metodología permite obtener plantas uniformes y de alta calidad, esenciales para la investigación y la agricultura moderna **(Norouzi et al., 2022).**

Los cultivos *in vitro* realizados en condiciones de laboratorio son independientes del clima y las estaciones, para facilitar la producción de plántulas durante todo el año. El objetivo principal de la micropropagación es producir múltiples clones de plantas con las mismas características que las plantas donantes **(Mazurek et al., 2024).** Las condiciones de esterilidad son cruciales debido a que el medio de cultivo contiene nutrientes que pueden favorecer la proliferación bacteriana y contaminar los explantes. La desinfección debe ser efectiva, pero procurando causar el mínimo daño al material vegetal; por ello se utilizan compuestos químicos en bajas concentraciones y se realiza un enjuague adecuado para eliminar residuos del desinfectante. En algunos casos se emplean antibióticos, aunque estos pueden tener efectos que ralentizan el proceso de organogénesis (**Norouzi et al., 2022).**

El cultivo *in vitro* explota la totipotencialidad de las células vegetales. Sin embargo, en la micropropagación lo más destacado es la formación de novo de meristemas de brotes, seguida por su crecimiento y enraizamiento **(Neves et al., 2021).** Los explantes mantienen sus funciones del meristemo apical; es decir, las células vegetales u órganos son capaces de generar nuevos brotes y raíces incluso después de que sus partes meristemáticas hayan sido eliminadas **(Bidabadi & Mohan, 2020).**

El cultivo del arándano puede llevarse a cabo de dos formas: mediante propagación sexual, que implica el uso de semillas, y asexual, que se realiza a través de estructuras vegetativas. La propagación por semillas es poco común en los arándanos debido a que las plántulas resultantes no conservan las características biológicas deseadas, esto se debe a la polinización cruzada y la segregación genética. Por lo tanto, para mantener las cualidades productivas, se prefiere la clonación mediante injertos **(Akimova et al., 2022; Giacobbo et al., 2023).** Respecto a la propagación sexual, la técnica de estratificación de semillas es esencial para interrumpir el periodo de dormancia y facilitar la germinación *in vitro.* Un estudio indicó que las semillas de *Vaccinium myrtillus* L. y *Vaccinium uliginosum* L. requieren

temperaturas de 4 - 5 °C durante 8 semanas, alcanzando tasas de germinación del 74.2 % y 88.3 %, respectivamente **(Harutyunyan et al., 2022).** La propagación asexual tiene la ventaja de producir grandes cantidades de material vegetal genéticamente idéntico, lo cual es beneficioso para su transferencia a la producción comercial de manera sostenible y económicamente eficiente **(Karapatzak et al., 2022).**

### 1.1.2.1 Importancia y aplicaciones de cultivo in vitro

El cultivo *in vitro* se ha considerado como una herramienta valiosa para la industria agrícola y para el ámbito de la investigación científica. Esta técnica, que ha evolucionado significativamente en las últimas décadas se han desarrollado métodos para la manipulación genética de las plantas para mejorar su productividad y conferirles mayor tolerancia a condiciones adversas, tanto físicas como químicas. Además, el cultivo *in vitro* es fundamental para incrementar la resistencia de las plantas a plagas y enfermedades, así como para la preservación de especies con valor económico, nutricional y medicinal **(Delgado et al., 2021).** La adopción de esta tecnología ha traído consigo avances en el fitomejoramiento y la micropropagación, lo que ha resultado en la producción de material vegetal de alta calidad.

Una de las contribuciones más notables del cultivo *in vitro* es su capacidad para eliminar patógenos de plantas infectadas, asegurando así la salud y la integridad del material vegetal. Además, ha permitido la conservación de germoplasma, esencial para la propagación vegetativa de cultivos, y ha ofrecido una vía para el rescate de plantas amenazadas y especies en peligro de extinción. Estos métodos no solo han revolucionado la forma en que se cultivan y mejoran las plantas, sino que también han abierto nuevas posibilidades para la sostenibilidad y la seguridad alimentaria. Con la ayuda del cultivo *in vitro*, los científicos pueden ahora explorar horizontes previamente inalcanzables en la conservación de la biodiversidad y en la lucha contra los desafíos agrícolas del futuro **(Jawale et al., 2020).**

### 1.1.2.2 Organogénesis

Las plantas, a diferencia de los animales, no tienen la capacidad de moverse de forma independiente, lo que las hace particularmente vulnerables a daños ambientales y ataques bióticos. Sin embargo, han evolucionado con una notable estrategia de supervivencia: la capacidad de regeneración. Esta habilidad es un testimonio de la resiliencia y adaptabilidad de las plantas frente a las adversidades **(Ikeuchi et al., 2016; Siamak & Mohan, 2020).** Esta capacidad regenerativa se da por la totipotencia de las células quienes deben pasar por un proceso de desdiferenciación y reprogramación para el

desarrollo de nuevos órganos o plantas enteras, la regeneración varía entre los taxones vegetales **(Bull & Michelmore, 2022; Sang et al., 2018).**

Bajo condiciones naturales y controladas, las plantas tienen la capacidad de regenerarse mediante dos procesos fundamentales: la organogénesis de novo y la embriogénesis somática. La organogénesis de novo implica la generación de nuevos órganos a partir de meristemos apicales, los cuales desarrollan brotes que eventualmente se diferencian en raíces, tal como lo detallan **Tesfaye & Haile (2024).** Este proceso se desencadena mediante la percepción de hormonas vegetales y la desdiferenciación de células somáticas especializadas. Estas células, una vez desdiferenciadas, se reintegran al ciclo celular desde un estado quiescente, organizándose luego en primordios y meristemos, según estudios recientes como los de **Lalthafamkimi et al, (2021).**

Este tipo de regeneración puede ser de manera directa e indirecta **(Raspor et al., 2021)**. La organogénesis directa usa explantes de tejidos somáticos como material primario **(Bull & Michelmore, 2022)**. La regeneración indirecta requiere de una fase intermedia de obtención de callos y de esta masa celular amorfa se desarrollan los órganos. A nivel *in vitro* los explantes deben ser incubados en medios con hormonas inductoras de callos como las auxinas (CIM), seguido de la transferencia a un medio suplementado con citoquininas (SIM) para la inducción de órganos **(Sang et al., 2018)**. En el caso de la embriogénesis somática básicamente está enfocada en la generación de embriones que darán a lugar a nuevas plantas, este proceso puede darse de manera directa e indirecta **(Bull & Michelmore, 2022)**.

#### 1.1.2.3 Enraizamiento

La micropropagación consta de cuatro fases: introducción de especies vegetales, multiplicación, enraizamiento y aclimatación. El enraizamiento *in vitro* es una etapa crucial porque busca desarrollar plantas con excelentes características fisiológicas y morfológicas que puedan sobrevivir a las condiciones de trasplante en el suelo **(Abdalla et al., 2022).** Durante esta fase, se cultiva *in vitro* una variedad de explantes, como raíces, tallos, hojas, semillas, flores y callos, aislados de la planta madre en un medio nutritivo estéril y adecuado. Este medio se complementa con reguladores de crecimiento que estimulan la activación de las células meristemáticas, las cuales se diferencian para formar las raíces **(Bettoni et al., 2024; Hasnain et al., 2022).**

El material vegetal debe ser vigoroso, ya que una vez separado de la planta madre se altera el flujo de nutrientes. En consecuencia, la supervivencia de la planta dependerá únicamente de la disponibilidad de elementos minerales presentes en los explantes, hasta que se restablezca el sistema radicular para la absorción de nutrientes. La recolección de los esquejes debe realizarse en un período

de enfriamiento, de modo que los brotes parentales rompan la latencia y logren un buen crecimiento vegetal **(Bannoud & Bellini, 2021).**

El enraizamiento *in vitro* se divide en varias etapas: inducción, activación celular, organización y expresión del enraizamiento. La inducción ocurre principalmente por estimulación en la base del esqueje, lo cual conduce a la formación de células especializadas que darán origen a las raíces, influenciadas principalmente por reguladores de crecimiento como las auxinas. La segunda etapa, la activación celular, se caracteriza por la división celular, culminando en la formación de una región específica de enraizamiento morfogenético. La tercera etapa involucra la organización de esta zona morfogenética en un meristemo radicular, y finalmente, en la etapa de expresión del enraizamiento, ocurre el crecimiento del meristemo radicular y la aparición de la primera raíz **(Moncousin, 1991).**

#### 1.1.2.4 Beneficio del enraizamiento in vitro

En la producción de especies vegetales, el enraizamiento directo en invernaderos presenta desafíos significativos que a menudo resultan en la pérdida considerable de material vegetal. Por esta razón, se ha adoptado el método de enraizamiento *in vitro* como una alternativa viable. No obstante, el arándano sigue siendo una de las especies con un índice de enraizamiento bajo en comparación con otras de similar importancia económica **(Santos et al., 2024).** Esta dificultad ha restringido la producción de plántulas de arándano, elevando sustancialmente su costo. La alta valoración de las plántulas desalienta a los agricultores que carecen de conocimientos técnicos especializados en el cultivo de esta especie **(Alvarado et al., 2022)**, afectando así su atractivo para la inversión y la expansión en la industria agrícola.

La micropropagación surge como un método esencial para superar las limitaciones de enraizamiento, especialmente porque bajo condiciones *in vitro* facilita el desarrollo de raíces más extensas y ramificadas. Estas raíces resultan en sistemas radiculares más robustos una vez trasladados al invernadero, reduciendo la susceptibilidad a daños mecánicos durante el trasplante **(Bettoni et al., 2024).** Además, la calidad de los brotes es un factor clave, ya que es un indicador directo de la salud y vitalidad de la planta resultante. Por otro lado, la micropropagación ofrece la ventaja de una multiplicación rápida de plantas durante todo el año, independientemente de las variaciones climáticas estacionales **(Lawson *et al.,* 2023).** Este aspecto temporal flexible es crucial para la industria agrícola, permitiendo una producción constante y eficiente que no se ve afectada por condiciones climáticas adversas.

El material vegetal *in vitro* debe trasladarse a la sala de aclimatación durante dos semanas antes de ser transferido al suelo. Este proceso implica la escisión aséptica de las plantas del recipiente de cultivo y el lavado cuidadoso de los medios de cultivo adheridos a las raíces del material vegetal antes del trasplante a macetas. Estas macetas contienen generalmente una mezcla de sustrato compuesta por tierra, arena, vermiculita, vermicompost y perlita **(Nishesh et al., 2023)**. Las macetas deben cubrirse con bolsas de polietileno transparente para mantener la humedad ambiental y luego colocarse en la habitación de incubación bajo las mismas condiciones ambientales en las que fueron cultivadas. Después de siete días, se debe retirar la cubierta plástica durante tres a cuatro horas diarias para exponer las plantas al aire. Finalmente, cuando las plantas estén bien adaptadas al ambiente controlado, se transfieren al invernadero y se retira la cubierta durante tres a cuatro horas diarias. Tras un mes, las plantas deben ser trasladadas al campo con condiciones naturales **(Oliya et al., 2022).**

El proceso de enraizamiento *in vitro* está influenciado por una serie de factores tanto intrínsecos como extrínsecos. Entre los factores intrínsecos destacan los niveles endógenos de componentes bioquímicos específicos y la genética de la planta, junto con el tipo de explantes utilizados. Estos elementos son cruciales para el desarrollo adecuado del sistema radicular durante la fase *in vitro*. Por otro lado, los factores extrínsecos como las condiciones ambientales controladas son igualmente determinantes. La composición precisa del medio de cultivo, la disponibilidad y tipo de carbohidratos, así como la presencia de reguladores del crecimiento y agentes gelificantes influyen significativamente en el éxito del enraizamiento **(Jafari *et al.,* 2022).**

#### 1.1.2.5 Tratamiento de material vegetal para cultivo *in vitro*

En la micropropagación vegetal, se pueden utilizar como material de partida explantes apicales, axilares u otras partes vegetales **(Murthy et al., 2023)**. La selección de la planta donante o matriz es crucial en la propagación asexual, ya que debe garantizar la viabilidad del cultivo. Es importante considerar el tipo de órgano empleado como explante, su fisiología y edad ontogénica (siendo preferibles los órganos jóvenes), la temporada en la que se recolecta la muestra y el estado sanitario de la planta donante, que debe tener una baja exposición a patógenos **(Norouzi et al., 2022).** La calidad fisiológica y bioquímica de las plantas madre influye en la inducción de respuesta, así como en la capacidad de enraizamiento de los explantes. Por esta razón, es recomendable emplear plantas donantes sanas y vigorosas **(Hesami et al., 2023)**. En el caso de los arándanos, se ha identificado que cada cultivar presenta diferencias en cuanto al contenido fenólico de sus explantes, y se ha observado que su viabilidad de enraizamiento está vinculada a esta variable. Se sugiere que los compuestos fenólicos actúan como promotores de enraizamiento al actuar en sinergia con las auxinas **(Santos et al., 2024)**.

### 1.1.2.6. Desinfección del material vegetal

La desinfección del material vegetal es una fase crítica en cualquier protocolo de cultivo de tejidos vegetales, ya que la contaminación por bacterias u hongos puede comprometer seriamente el éxito del establecimiento del cultivo *in vitro* **(Teixeira et al., 2019).** Antes de introducir el material vegetal en el medio de cultivo estéril, es crucial esterilizar la superficie de los explantes inmediatamente después de ser tomados de la planta madre. Este proceso se realiza para eliminar los microrganismos que puedan estar adheridos. Por lo general, se utilizan soluciones acuosas desinfectantes como hipoclorito de sodio (NaOCl), etanol ($C_2H_6O$) y cloruro mercúrico ($MgCl_2$), además de detergentes como Teepol y Tween 20, seguidos de un enjuague final con agua destilada esterilizada **(Hajare et al., 2021; Wawrosch & Zotchev, 2021).** Estas medidas aseguran que los explantes estén libres de contaminantes antes de iniciar el cultivo *in vitro*, optimizando así las condiciones para un crecimiento saludable y libre de patógenos en el laboratorio.

El etanol es reconocido por su eficacia como agente esterilizante en el proceso de cultivo de tejidos vegetales, aunque su alta fitotoxicidad debe ser manejada con precaución. Este compuesto tiene la capacidad de desnaturalizar las proteínas de virus lipofílicos y deshidratar esporas fúngicas, inhibiendo así su proceso de esporulación y germinación **(Basiry et al., 2022; Rafiq et al., 2021).** Específicamente, el alcohol isopropílico es efectivo contra bacterias, mientras que el alcohol etílico muestra una mayor eficacia contra los virus. Para asegurar una mayor asepsia en los explantes, se utiliza etanol de alta pureza. Sin embargo, debido a su capacidad para deshidratar los tejidos, los explantes suelen ser expuestos al etanol solo por unos segundos o minutos. La tolerancia al etanol varía según el tipo de tejido vegetal: los tejidos más tiernos pueden ser más susceptibles al daño causado por el alcohol. Por ejemplo, tejidos como semillas, yemas laterales o brotes florales sin abrir pueden ser expuestos por períodos más prolongados, dado que el tejido que se explantará se encuentra protegido dentro de la estructura superficial que está siendo esterilizada. Este proceso meticuloso asegura que los explantes estén libres de contaminantes antes de ser introducidos en el medio de cultivo estéril, optimizando así las condiciones para un crecimiento saludable y exitoso en el laboratorio **(Sameer & Nabeel, 2016)**.

El hipoclorito de sodio (NaOCl) se ha consolidado como una opción frecuente y efectiva para la desinfección superficial del material vegetal debido a su amplio espectro antAIBcteriano, capaz de eliminar rápidamente esporas vegetales, bacterias, hongos, virus y protozoos **(Govindaraju et al., 2022).** La exposición adecuada de los explantes a este desinfectante oscila entre 5 y 20 minutos, aunque es crucial ajustar tanto la concentración como el tiempo de tratamiento según el tipo de explante, para evitar su potencial fitotoxicidad **(Sameer & Nabeel, 2016)**. Este agente liberador de halógeno se descompone solución acuosa, formando el ion hipoclorito ($OCl^-$) y ácido hipocloroso (HOCl). Ambos

tienen la capacidad de oxidar los grupos sulfhídricos de las enzimas microbianas, lo que conduce a la alteración de las proteínas de las membranas y, en última instancia, a la muerte celular. Además, el NaOCl exhibe efecto esporicida al degradar el peptidoglicano de las esporas inactivas **(Jones & Joshi, 2021).**

El ion $OCl^-$, debido a la presencia de la bicapa lipídica en la membrana celular microbiana, no puede penetrarla, por lo tanto, su acción oxidante se limita al exterior celular, resultando en la ruptura o desintegración de la pared y membrana celular durante el proceso de desinfección **(Fukuzaki, 2006).** En contraste, el HOCl puede atravesar la bicapa lipídica de la membrana plasmática por difusión pasiva, aprovechando su neutralidad eléctrica y tamaño molecular similar al del agua. Esta capacidad permite al HOCl atacar tanto desde el exterior como desde el interior de la célula microbiana, lo que acelera la inactivación de los patógenos y reduce significativamente su carga en la superficie del material vegetal **(Fukuzaki, 2006).**

El cloruro de mercurio (HgCl2) se destaca como un agente antimicrobiano eficaz contra hongos y bacterias, aunque su uso es menos frecuente debido a su alta toxicidad **(Basiry et al., 2022).** Este derivado metálico actúa como desinfectante al interferir con los procesos metabólicos esenciales de los microorganismos, lo que resulta en la inhibición de su crecimiento y reproducción. Sin embargo, debido a su potencial peligro para la salud y el medio ambiente, se utiliza con cautela y preferiblemente en situaciones donde otros agentes desinfectantes no son adecuados. Para mejorar la eficacia de los antimicrobianos como el HgCl2, se recurre a tensoactivos como el Tween, que ayudan a superar la selectividad en la permeabilidad de las membranas bacterianas **(Aonofriesei, 2022).** Estos compuestos permiten una mejor penetración y distribución de los agentes desinfectantes en la superficie de los explantes vegetales, asegurando una desinfección más completa y efectiva.

En el proceso de desinfección superficial de explantes, varios factores influyen significativamente, como los tipos de soluciones desinfectantes utilizadas, sus concentraciones específicas, la duración del tratamiento y el tipo particular de explante vegetal **(Hazubska, 2019; Kaur et al., 2022).** Es crucial encontrar un equilibrio entre la efectividad del desinfectante y la preservación de la integridad del material vegetal, ya que el daño durante el proceso puede reducir la tasa de supervivencia y comprometer el éxito del cultivo *in vitro*. Aunque los tratamientos de esterilización simples pueden mostrar altas tasas de supervivencia del material vegetal, frecuentemente resultan en índices bajos de cultivos asépticos, especialmente dependiendo del tipo de planta y explante utilizado **(Rafiq et al., 2021).** Por lo tanto, la combinación adecuada de agentes desinfectantes y el diseño preciso del protocolo son fundamentales para asegurar resultados consistentes y exitosos en la micropropagación vegetal.

#### 1.1.2.7 Oxidación vegetal

La oxidación de los explantes surge como resultado de la presencia de formas reducidas de oxígeno, en respuesta al estrés tanto abiótico como biótico experimentado por las plantas **(Mansoor et al., 2022).** Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan típicamente en las mitocondrias y cloroplastos debido a las reacciones metabólicas intrínsecas de la planta, pero también pueden surgir en organelos celulares como los lisosomas y peroxisomas durante el proceso de extracción de explantes **(Filiz et al., 2019; Azofeifa, 2008).** Los desequilibrios en los niveles de ROS desencadenan respuestas complejas, como cambios en la expresión génica destinados a mejorar la tolerancia al estrés y promover el desarrollo vegetal adaptativo. Sin embargo, niveles excesivos de ROS también pueden llevar a la apoptosis celular o a la necrosis, resultando en daño irreversible **(Aazami et al., 2021; Mansoor et al., 2022; Mosoh et al., 2023).**

La fotooxidación es un proceso que causa daño significativo a varios componentes celulares, como lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, cuando no se gestionan adecuadamente los radicales libres. Este fenómeno ocurre cuando los sistemas antioxidantes de la planta no son eficientes para neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS), que se forman como resultado del estrés abiótico y biótico **(Farooq et al., 2019; Mansoor et al., 2022).** La metabolización de los ROS se lleva a cabo mediante antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos, que desempeñan un papel crucial en la protección de las células vegetales contra el estrés oxidativo. Entre las enzimas antioxidantes, el polifenol oxidasas (PPO) presentes en los cloroplastos y las peroxidasas (POX) localizadas en los peroxisomas juegan roles clave. Estas enzimas interactúan con compuestos fenólicos acumulados en las vacuolas como respuesta al estrés, lo cual puede desencadenar la muerte del explante si no se controla adecuadamente **(Farooq et al., 2019; Zhao et al., 2021).**

#### 1.1.2.8 Medios de cultivo para cultivo *in vitro*

En los últimos cinco años, el medio Murashige & Skoog (MS) ha dominado la investigación en micropropagación *in vitro*, siendo utilizado en un 82% de los estudios, mientras que el Woody Plant Medium (WPM) ha sido empleado en un 6% de los casos **(Phillips & Garda, 2019).** Estos medios de cultivo vegetal son esenciales por su composición precisa de nutrientes inorgánicos y orgánicos, que incluyen vitaminas, carbohidratos y reguladores de crecimiento. La correcta composición nutricional es crucial para asegurar la supervivencia de las plantas en micropropagación y para mitigar posibles trastornos fisiológicos. Las concentraciones específicas de macronutrientes (mayores a 0,5 mM/L) y micronutrientes (menores a 0,5 mM/L) tienen un impacto directo en las etapas de morfogénesis y organogénesis, pudiendo incluso provocar toxicidad en las plántulas **(Hameg *et al*., 2020).**

La preparación meticulosa de los componentes orgánicos en soluciones madre individuales, utilizando agua de doble destilación, garantiza la obtención de soluciones químicamente definidas **(Phillips & Garda, 2019).** Este proceso es fundamental para obtener resultados reproducibles y óptimos en los experimentos de micropropagación vegetal. Además, las condiciones adecuadas de incubación juegan un rol crucial al facilitar el desarrollo óptimo del tejido vegetal mediante una adecuada aireación, intensidad de luz y temperatura controlada. Esto asegura un entorno libre de patógenos vegetales, vital para el crecimiento saludable de las plantas **(Sabatino, 2020).** Los métodos de esterilización varían según la sensibilidad al calor de los componentes del medio. Por ejemplo, para componentes como la sacarosa, que es sensible al calor, se utilizan filtros para evitar su caramelización a altas temperaturas, lo cual permite regular la presión osmótica del medio de cultivo **(Phillips & Garda, 2019).**

Además, es crucial considerar el tipo de gelificante utilizado, ya que este influye en las respuestas de los cultivos vegetales. El medio MS, reconocido por sus altas concentraciones de nitrógeno, es preferido para el cultivo de tejidos vegetales de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. En contraste, el medio WPM se utiliza en plantas leñosas debido a su baja concentración de nitrógeno y mayor contenido de azufre, reduciendo así la toxicidad potencial por amonio ($NH_4^+$) **(Phillips & Garda, 2019).** Este hecho resalta la importancia de mantener un equilibrio adecuado entre las formas de nitrógeno nitrato ($NO_3^-$) y amonio en el medio de cultivo, especialmente en cultivos como los arándanos **(Schuchovski & Biasi, 2019).**

#### 1.1.2.9 Rol de las fitohormonas en el cultivo vegetal

Las fitohormonas son sustancias químicas de señalización que se producen de manera natural en las plantas y que regulan diversos procesos fisiológicos mediante la coordinación de la actividad celular a través de mensajes químicos, estimulando el crecimiento, desarrollo y diferenciación de células y tejidos **(Lee et al., 2019).** Existen cinco tipos principales de fitohormonas: ácido abscísico, etileno, giberelinas, citoquininas y auxinas **(Malik et al., 2023).**

El ácido abscísico está asociado principalmente con respuestas al estrés, actúa como inhibidor del crecimiento y favorece el desarrollo de tejidos protectores **(Chen et al., 2020).** El etileno, un gas simple, regula la maduración de los frutos y la caída de las hojas, jugando un papel crucial en la respuesta de la planta a condiciones ambientales adversas como el estrés biótico y abiótico **(Binder, 2020).** Las giberelinas juegan un papel crucial como reguladores en el proceso de germinación, expansión de las hojas y elongación del tallo **(García et al., 2021).** Por otro lado, las citoquininas y las

auxinas controlan el crecimiento y desarrollo de las células madre en los meristemos apicales de los brotes y meristemos florales, además de responder al estrés y a la senescencia **(Lee et al., 2019).**

Las auxinas se sintetizan y están presentes en toda la planta, con máxima biosíntesis en cotiledones, brotes y raíces, y se consideran reguladores clave del crecimiento, alargamiento de la raíz primaria (PR) y formación de raíces laterales (LR) **(Rivas et al., 2022)**. La familia de auxinas naturales está compuesta por varias moléculas aromáticas pequeñas con ácido carboxílico, como el ácido indol-3-acético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido 4-cloroindol-3 y ácido fenilacético **(Blaacutezquez et al., 2020)**. Normalmente, el AIA se produce en la región meristemática apical de brotes, yemas y la punta de raíces en las plantas. Además, la concentración de esta fitohormona juega un papel importante, ya que concentraciones altas de AIA inhiben el alargamiento de la raíz, y viceversa **(Mukherjee et al., 2022)**. A diferencia del ácido indol-3-acético (AIA), la fitohormona ácida indolbutírico (AIB) se encuentra en niveles bajos, pero influye en el desarrollo de las plantas mediante la β-oxidación de la cadena lateral de carbono. Esta fitohormona está correlacionada con la formación de raíces adventicias **(Gomes & Scortecci, 2021)**.

Las auxinas AIB y ANA provocan inicialmente un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$), superóxido ($O_2^-$) e hidroxilo ($OH^-$). Este efecto se atribuye posiblemente a una mayor actividad de la peroxidasa (POD), una enzima involucrada en el metabolismo oxidativo y la producción de $H_2O_2$. Este proceso facilita la acumulación endógena de ácido indolacético (AIA), estimulando así la división y elongación celular durante la fase de enraizamiento en las plantas. En consecuencia, se promueve el crecimiento de nuevas raíces adventicias **(Elmongy et al., 2020).** Las fitohormonas se producen en bajas concentraciones (pmol/L a fmol/L) en el tejido vegetal, por esta razón se emplean hormonas sintéticas que controlan procesos similares en la formación y crecimiento de yemas, flores, frutos y raíces **(Zahid et al., 2023).** Para el desarrollo de raíces a nivel *in vitro*, las auxinas sintéticas de mayor incidencia son ANA y AIB, las cuales no presentan fotosensibilidad **(Shivani et al., 2021).**

## 1.2 Objetivos

### Objetivo General

- Optimizar el proceso de enraizamiento *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedad Biloxi

### Objetivos Específicos

- Analizar el tratamiento más eficiente de desinfección vegetal en explantes internodales de *V. corymbosum* L. variedad Biloxi.
- Determinar la efectividad de los medios de cultivo Murashige-Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM) en la inducción de raíces de arándano variedad Biloxi.
- Identificar la mejor fitohormona ANA y AIB en la fase de enraizamiento *in vitro* de los explantes internodales de arándano variedad Biloxi.

## CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

### 2.1 Métodos

El trabajo de titulación fue experimental y se realizó en los laboratorios académicos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

### 2.2 Análisis del tratamiento más eficiente de desinfección vegetal en explantes internodales de (*V. corymbosum* L) variedad Biloxi.

#### 2.2.1 Diseño experimental

Para el proceso de enraizamiento *in vitro*, se utilizó material vegetal de plantas de arándano *(Vaccinium corymbosum* L*.)* del cultivar Biloxi, obtenidas del vivero Leplant en la provincia de Cotopaxi, parroquia Mulaló. Las plantas tenían una edad fisiológica de 41 semanas.

La unidad experimental para la etapa de desinfección consistió en un frasco de micropropagación que contenía 75 ml de diferentes medios de cultivo: Murashige-Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM). Cada frasco fue inoculado con cinco explantes previo a ser expuestos a los tratamientos de desinfección tal y como se evidencia en la Tabla 2, y para cada tratamiento se realizaron cuatro réplicas biológicas experimentales (**Wang et al., 2023)**. Para analizar cada una de las variables respuesta, se aplicaron tablas de contingencia debido a la naturaleza de los datos (datos cualitativos). Este análisis se realizó utilizando el software Minitab 22.1.0.0 versión de prueba gratuita por 30 días. Las variables respuesta a analizar fueron:

Para determinar la variable del porcentaje de contaminación, se realizaron observaciones frecuentes de los tratamientos desde el primer día de siembra hasta 20 días después. Se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%\, Contaminación = \frac{Número\ de\ explantes\ contaminados}{total\ de\ explantes} * 100 \qquad (Ecuación\ 1)$$

Para la variable del porcentaje de oxidación, se debe considerar que la necrosis de los explantes está directamente relacionada con el estrés que sufre el material vegetal frente a los agentes desinfectantes. Esta necrosis, expresada como oscurecimiento de los explantes o presencia de tonalidades amarillas, se evaluó visualmente **(Mendez & Abdelnour, 2014; Montesinos et al., 2023)** desde el día de la siembra hasta 7 días después. Se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \, oxidación = \frac{Número \, de \, explantes \, oxidados}{total \, de \, explantes} * 100 \qquad (Ecuación \, 2)$$

El porcentaje de viabilidad se obtuvo al contabilizar los explantes que se establecieron con éxito desde el día de siembra hasta los 45 días posteriores, y se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \, viabilidad = \frac{Número \, de \, explantes \, vivos}{total \, de \, explantes} * 100 \qquad (Ecuación \, 3)$$

**Tabla 2.**

Composición de los tratamientos de desinfección.

| **Tratamientos** | **Desinfectantes** | **Tiempo** |
|---|---|---|
| A | Hipoclorito de sodio 2 % | 15 minutos |
| B | Hipoclorito de sodio 1,5 % | 20 minutos |
| Control | - | - |

**Nota:** Arencibia et al. (2013) y Hine & Abdelnour, (2013).

La elección de dos concentraciones de hipoclorito de sodio (1.5% y 2%) y dos tiempos de exposición (20 minutos y 15 minutos) se justificó por los siguientes motivos: Estudios previos demostraron que el uso de hipoclorito de sodio al 3% en variedades como "Biloxi", Sharpblue, Woodard y Bonita resultaba en bajos porcentajes de viabilidad y alta oxidación de los explantes **(Angulo et al., 2015; Arencibia et al,. 2013)**. Aunque concentraciones de 1.5% de hipoclorito de sodio acompañadas de otros reactivos desinfectantes tóxicos mostraron una contaminación del 0%, el uso de estos reactivos presentaba riesgos para la salud y el medio ambiente **(Tejada et al., 2022)**. Por lo tanto, optamos por concentraciones moderadas de hipoclorito de sodio evitando otros agentes tóxicos para minimizar estos riesgos, optimizando la desinfección y garantizando la viabilidad de los explantes sin comprometer la seguridad del personal ni el medio ambiente.

### 2.2.2 Selección de los explantes óptimos de arándano Biloxi

Para la selección de los explantes se siguió la metodología propuesta por **Budau y colaboradores (2023)**. Bajo condiciones de completa asepsia, se procedió a eliminar la base de la planta, la parte apical y las hojas (Anexo 1) de los explantes internodales de arándano, con el objetivo

de eliminar posibles focos de contaminación. Esto garantizó la obtención de plantas sanas, vigorosas y libres de patógenos.

### 2.2.3 Desinfección del material vegetal fuera de la cámara

El proceso de desinfección se ajustó a la metodología de **Arencibia et al., (2013); Hine & Abdelnour, (2013)** con algunas modificaciones. Antes del corte de las estacas, se realizó un pretratamiento que consistió en lavarlas con agua y jabón comercial, utilizando un cepillo. Luego, se cortaron estacas de arándano de la variedad Biloxi de 2 cm de longitud, las cuales fueron desinfectadas con una solución jabonosa diluida (1:2) y agitadas durante 20 minutos, seguido de un triple enjuague con agua corriente. Posteriormente, las estacas se sumergieron en una solución bactericida Trimix durante 15 minutos con agitación (anexo 2). Finalmente, se realizaron enjuagues con agua destilada **(Cepeda, 2023).**

### 2.2.4 Desinfección del material vegetal dentro de la cabina

Después del tratamiento con el fungicida, se prepararon dos tratamientos, (A) y (B) (anexo 3). En el primer tratamiento evaluado (A), las estacas fueron sumergidas en hipoclorito de sodio al 2% por 15 minutos. Concluido este periodo, se realizaron tres enjuagues con agua estéril. Seguidamente, los explantes se incubaron en etanol al 70% durante 1 minutos. En cuanto al segundo tratamiento (B), los explantes se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1,5% por 20 minutos, seguido de una incubación en etanol al 70% durante 1 minuto. Una vez concluido el periodo en etanol al 70% para ambos tratamientos (A) y (B), se realizaron tres enjuagues con agua estéril. Las explantes de los tratamientos (A) y (B) se colocaron en recipientes estériles para su posterior siembra **(Arencibia et al., 2013; Hine & Abdelnour, 2013).**

## 2.3 Determinación de la efectividad de los medios de cultivo Murashige-Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM) en la inducción de raíces de arándano variedad Biloxi

### 2.3.1 Diseño experimental

Para determinar la eficiencia de los medios de cultivo, se empleó un diseño completamente al azar con un total de tres tratamientos (Tabla 3). La unidad experimental utilizada fue la misma que se empleó en estudios anteriores **(Ornella & De la Cruz, 2019; Wang et al., 2023).**

La formación de raíces se evaluó mediante las variables: longitud de las raíces (mm), número de raíces, porcentaje de enraizamiento y días necesarios para el proceso de enraizamiento, El tiempo para la verificación de las variables fue de 30 días después de la siembra, según lo propuesto por **Zhou et al., (2023**). Para analizar cada una de las variables de respuesta, se llevó a cabo un análisis factorial de un solo factor ANOVA. Con el fin de identificar diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó el método d e Tukey con un nivel de significancia del 5%. Este análisis se realizó utilizando el software Minitab 22.1.0.0 versión de prueba gratuita por 30 días.

$$Porcentaje\ de\ enraizamiento = \frac{Número\ de\ explantes\ brotados}{Total\ de\ explantes\ por\ tratamiento} * 100 \quad (Ecuación\ 4)$$

En cuanto a la eficiencia en el establecimiento de explantes internodales se utilizó lo descrito por **Guamán, (2022)** con ciertas modificaciones, las variables a evaluar serán; longitud de brote, número de hojas por explantes.

- Longitud del brote (mm)

Para la media de esta variable, se tomaron como medida los tamaños de los brotes que se fueron desarrollando a lo largo de las semanas.

$$Longitud\ de\ brote = Longitud\ final - Longitud\ inicial \quad \text{(Ecuación 5)}$$

- Número de hojas por explantes, esta variable se registrará cada 7 días durante el periodo de experimentación.

**Tabla 3.**

Condiciones de tratamientos.

| Tratamientos | Medio de cultivo |
|---|---|
| 1 | Murashige-Skoog (MS) |
| 2 | Woody Plant Medium (WPM) |
| Control negativo | Agar |

### 2.3.2 Preparación de medios de cultivo

La preparación de los medios de cultivo Woody Plant Medium (WPM) y Murashine & Skoog (MS) se ejecutaron siguiendo la metodología de los estudios de **Menenses et al., (2022)** con modificaciones **y Harutyunyan et al., 2022,** respectivamente. Los medios fueron pesados y suplementados con 30 g/L de sacarosa. Con ayuda del potenciómetro, el pH se ajustó a 5,2 con NaOH (1N) y HCl (1N). Los medios se solidificaron con 7 g/L de agar vegetal.

El proceso de esterilización de los medios de cultivo se llevó a cabo en la autoclave durante 20 minutos a 121°C. Los frascos de cultivo, hechos de vidrio Soda-Cal-Sílice resistente a altas temperaturas, facilitaron su esterilización en la autoclave bajo las condiciones mencionadas.

En la cabina de flujo laminar y cerca de un mechero, se vertieron 75 ml de los medios en frascos estériles (anexo 4, A). Posteriormente, se cubrieron los frascos con papel film y se dejaron reposar durante 7 días para observar la posible contaminación.

### 2.3.3 Preparación de material vegetal

Para este apartado los esquejes tuvieron la misma longitud de 2 cm, y se desinfectaron con los tratamientos **A** y **B.**

### 2.3.4 Siembra de explantes internodales

En la cabina de flujo laminar y cerca del mechero, se introdujeron explantes internodales de 2 cm de largo en los frascos con los diferentes medios de cultivo MS y WPM (Anexo 4, B). Es importante señalar que, antes de la introducción de cada explante, las pinzas se esterilizaron en el mechero con alcohol al 96%, hasta alcanzar un color incandescente.

Una vez introducidos los cinco esquejes en cada unidad experimental, se flameó la boca del frasco y se cubrió con papel film, el cual fue expuesto a luz UV. Finalmente, los cultivos se trasladaron al estante de micropropagación a una temperatura de 25 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad **(Wang et at., 2023).**

## 2.4. Identificación de la mejor fitohormona ANA y AIB en la fase de enraizamiento *in vitro* de los explantes de arándano variedad Biloxi.

### 2.4.1 Diseño experimental

Para determinar la fitohormona más efectiva, se analizaron tratamientos combinados apreciables en la Tabla 4. Al igual que en los métodos anteriores, se empleó una unidad experimental consistente en 75 ml de medio de cultivo combinado con fitohormonas.

Para evaluar las variables de respuesta, se siguieron los métodos descritos por **Zhou et al., (2023).** Las variables evaluadas fueron: longitud de las raíces (mm), días necesarios para el proceso de enraizamiento, número de raíces y porcentaje de enraizamiento **(López et al., 2017).** Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, utilizando el software Minitab 22.1.0.0 versión de prueba gratuita por 30 días. Para identificar diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%.

**Tabla 4.**

Condiciones de tratamientos.

| Tratamientos | Variables | |
|---|---|---|
| | Medio de cultivo | Fitohormona |
| 1 | WPM | ANA |
| 2 | MS | ANA |
| 3 | WPM | AIB |
| 4 | MS | AIB |
| Control negativo | WPM | - |
| Control negativo | MS | - |

**Nota:** Murashige-Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA).

### 2.4.2 Preparación de medios de cultivos combinado con fitohormonas ácido Indolbutírico (AIB) y ácido naftalenacético (ANA)

Los medios de cultivo se prepararon según lo descrito en el apartado 2.3.1. La diferencia radica en que la suplementación con las fitohormonas AIB y ácido naftalenacético (ANA) se realizó antes del ajuste del pH del medio de cultivo. La dosis de fitohormonas añadida fue de 1,5 mg/L, de acuerdo con el estudio de **Harutyunyan y colaboradores (2022).**

### 2.4.3 Preparación del material vegetal

Los esquejes de 2 cm de longitud procedieron de las plantas con las mismas condiciones iniciales. Estos se desinfectaron con los tratamientos **A** y **B,** descritos en los aparatados **2.1.3.** y **2.1.4,** respectivamente antes de su introducción en las unidades experimentales.

### 2.4.4 Siembra de explantes

Dentro de la cabina de flujo laminar y cerca de un mechero, se sembró el material vegetal en frascos que contenían medio y fitohormonas: MS - AIB, MS - ANA, WPM - AIB y WPM - ANA. Posteriormente, se flamearon los frascos inoculados y se cubrieron con papel film. Finalmente, se trasladaron al estante de micropropagación a 25 ± 2 °C (anexo 5), con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad **(Wang et at., 2023)**.

## CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Desinfección de explantes internodales de *Vaccinium corymbosum L. cultivar Biloxi*

En la Tabla 5 se observan los resultados para la aplicación de los diferentes tratamientos de desinfección con su respectiva variable de respuesta.

**Tabla 5.**

Porcentajes de contaminación, oxidación y viabilidad de explantes de *Vaccinium corymbosum* L. cultivar Biloxi bajo dos tratamientos de desinfección.

| Desinfección | Contaminación | Oxidación | Viabilidad |
|---|---|---|---|
| **D0** | 73,4% | 0% | 0% |
| **D1** | 18,0% | 15,0% | 87,0% |
| **D2** | 9,0% | 7,0% | 91,0% |

**Nota:** D0: control negativo. D1: tratamiento de desinfección 1 (Hipoclorito de sodio 1,5%) y D2: tratamiento de desinfección 2 (Hipoclorito de sodio 2%).

Se lograron porcentajes destacados de contaminación, libre de oxidación y alta viabilidad con el tratamiento de desinfección 2 (D2), por ende, resultó ser el más efectivo. En términos de contaminación, este tratamiento registró un porcentaje del 9%, mientras que el tratamiento D1 mostró un nivel de contaminación del 18%. Adicionalmente, el tratamiento D2 exhibió resultados favorables en cuanto a la viabilidad celular con un 91% y en la oxidación con un 7%. Los datos cualitativos obtenidos fueron analizados mediante el método estadístico descriptivo de tablas de contingencia, lo que permitió inferir una diferencia significativa entre los tratamientos de desinfección, confirmando que el tratamiento 2 es el más efectivo (Anexo 6, 7, 8).

#### 3.1.1 Contaminación

El elevado porcentaje de tratamientos sin contaminación microbiana (D1 y D2) se pudo deber al uso del agente desinfectante hipoclorito de sodio (NaOCl), conocido por su alta capacidad oxidativa, que puede reaccionar químicamente con los compuestos constituyentes de los microorganismos **(Jones & Joshi, 2021)**. El mecanismo de acción de este desinfectante consiste en la destrucción de la pared y la membrana celular, extendiéndose posteriormente hacia el interior de la célula microbiana y afectando el material genético (ADN o ARN), lo cual induce la muerte celular **(Yoo, 2018)**. La efectividad bactericida de NaOCl depende del tiempo de exposición y concentración; mantener un equilibrio

adecuado entre estos factores es crucial al aplicarlo sobre el material vegetal, ya que cualquier descompensación puede tener un impacto negativo en la tasa de supervivencia de los explantes vegetales **(Zabed et al., 2019)**.

Se observa una notable reducción en la tasa de contaminación (9%) en los explantes tratados con una concentración del 2% de NaOCl (Figura 1). Este hallazgo concuerda con los resultados presentados por **Ahmadpoor et al. (2022)** en su investigación con explantes de *Melia azedarach* L. Sin embargo, es importante destacar que Ahmadpoor y sus colaboradores utilizaron dos agentes desinfectantes diferentes: inicialmente con peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$) y luego NaOCl. Los resultados de este trabajo destacan que puede ser necesario emplear un único agente desinfectante para lograr una reducción significativa en la tasa de contaminación.

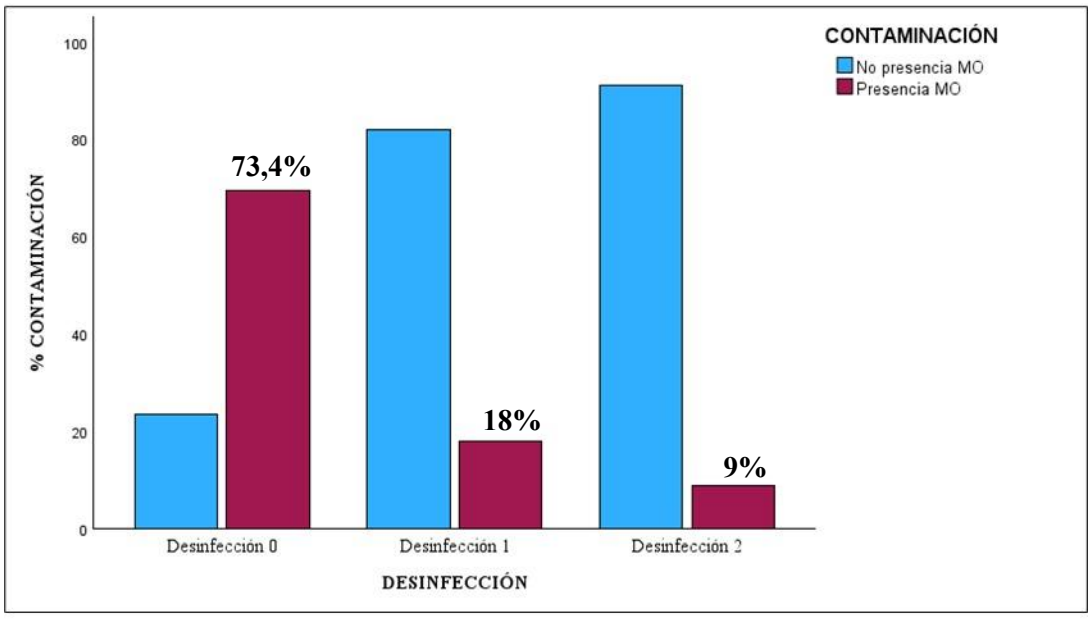



**Figura 1.** Porcentaje contaminación de explante de *Vaccinium corymbosum* L. cultivar Biloxi con diferentes tratamientos de desinfección.

**Nota:** MO (Microorganismos), desinfección 0 (tratamiento control), desinfección 1 (Hipoclorito de sodio 1,5%) y desinfección 2 (Hipoclorito de sodio 2%).

Existen protocolos de desinfección que han utilizado una mayor concentración de agentes esterilizantes, como el caso de **Angulo et al., (2015)**, quienes aplicaron 3% de NaOCl durante 10 minutos para desinfectar arándanos. En su estudio, observaron niveles de contaminación del 13% para Sharpblue, 11% para Delite, 9% para Bonita y 7% para Woodard. Los resultados obtenidos en este trabajo destacan que el uso de una baja concentración de NaOCl puede generar resultados favorables,

ya que se logró un 9% de contaminación con una dosis menor, aunque con un tiempo de exposición más prolongado. Por otra parte, la presencia de microorganismos en ambos tratamientos de desinfección, como se observa en la Figura 2, lo que podría atribuirse a una contaminación latente o a la introducción accidental de contaminantes durante la transferencia de los explantes de un lugar a otro **(Gammoudi et al., 2022)**. Otra posible fuente de contaminación podría ser la falta de mantenimiento en los filtros HEPA de la cabina de flujo laminar; si no se limpian ni se reemplazan regularmente, pueden convertirse en trampas microbianas comprometiendo la integridad del medio estéril **(Ouyang et al., 2023)**.

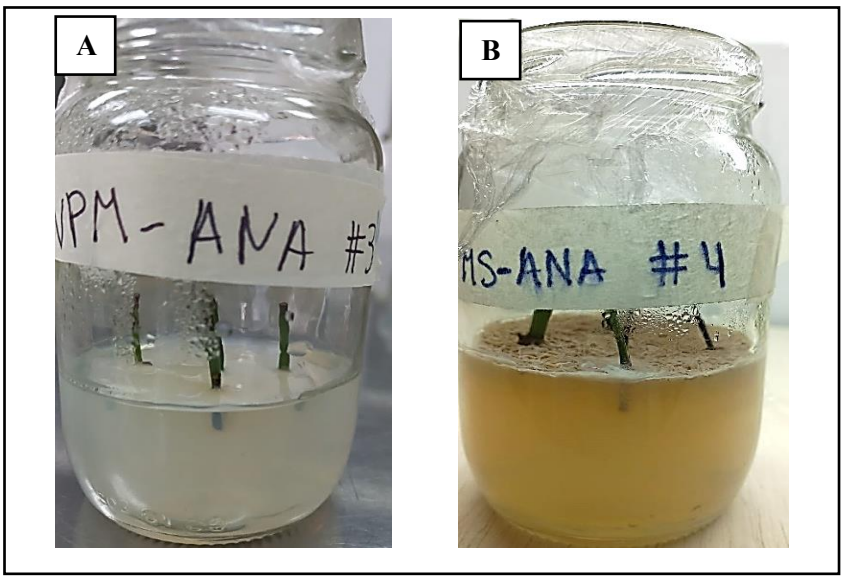



**Figura 2.** Tratamientos con hipoclorito de sodio al 2%.

**Nota:** A) Medio MS con presencia de bacteria B) Medio WPM con presencia de bacteria, a los 20 días de la siembra de los explantes.

### 3.1.2 Oxidación y viabilidad

Los tratamientos biológicos presentaron niveles altos de oxidación y viabilidad al aplicar el método de desinfección 2 apreciable en la Figura 3. El tratamiento D2 destacó con un 7% en oxidación y 91% de viabilidad, a diferencia del tratamiento D1, que registro un 15 % y 87% de oxidación y viabilidad respectivamente. Se destaco la eficiencia del tratamiento D2 al compararlo con el grupo control.

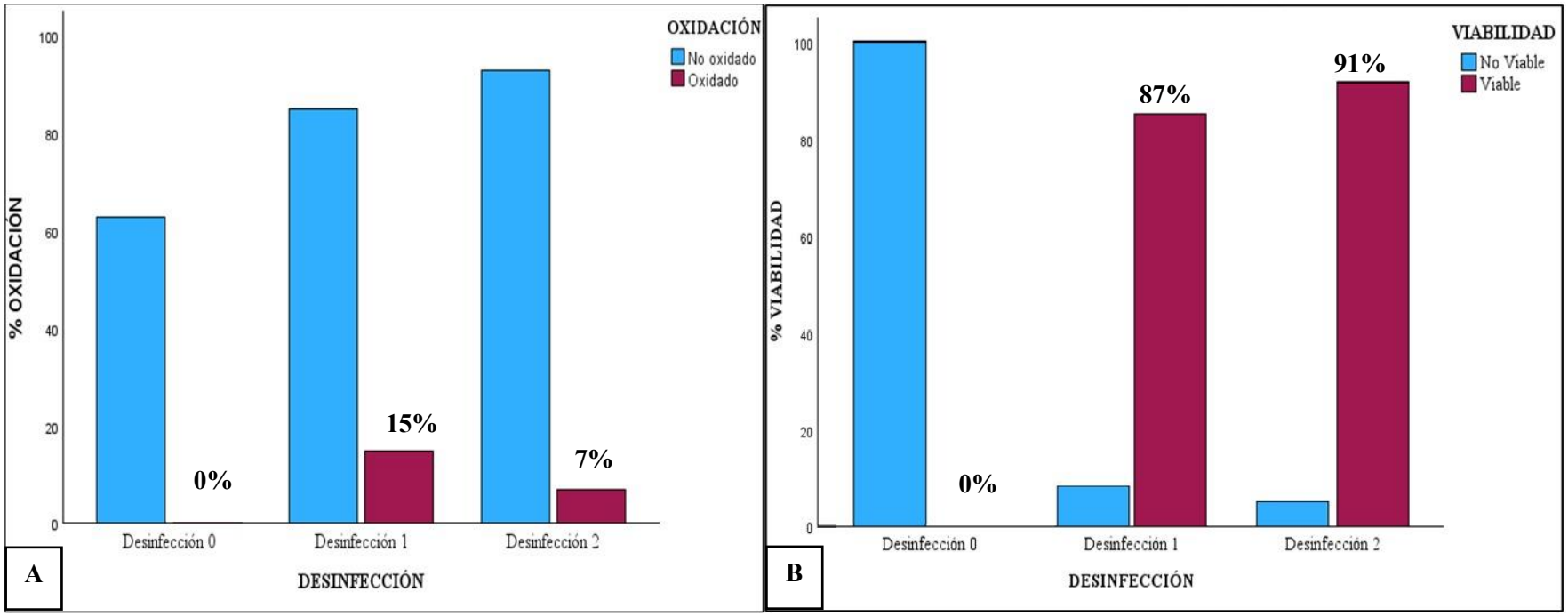



**Figura 3.** Porcentaje de oxidación y viabilidad de explantes de *Vaccinium corymbosum* L. cultivar Biloxi con dos tratamientos de desinfección.

**Nota:** A) Oxidación, B) Viabilidad. Desinfección 0 (tratamiento control), desinfección 1 (Hipoclorito de sodio 1,5%) y desinfección 2 (Hipoclorito de sodio 2%).

La desinfección del tratamiento D1 mostró una baja tasa de supervivencia y alta oxidación, alcanzando el 87% y el 15% respectivamente. Este fenómeno se pudo deber a que la oxidación es una respuesta vegetal frente a la exposición a factores de estrés abióticos y bióticos, lo que provoca la muerte celular y la pérdida completa del explante **(Mansoor et al., 2022)**. Para prevenir la oxidación, es crucial considerar el grado de abrasión de los agentes desinfectantes y el tiempo de exposición de los explantes al NaOCl, con el fin de minimizar la expresión de genes relacionados con la autofagia **(Azofeifa, 2008)**. Además, el daño mayormente se atribuye a los efectos del ion sodio ($Na^+$), que normalmente no está presente en las plantas. Por otro lado, la viabilidad está influenciada por características propias de los explantes vegetales, como su edad fisiológica, ya que los explantes más maduros tienden a sufrir menos efectos fitotóxicos y presentan una mayor tasa de supervivencia **(Rafiq et al., 2021).**

En el estudio de **Angulo et al., (2015)**, se menciona que diversas variedades de arándano (Sharpblue, Woodard, Delite y Bonita) fueron desinfectadas con NaOCl al 3% durante 10 minutos, lo que resultó en un porcentaje de oxidación del 26,5% y una contaminación del 17,5%. Los resultados obtenidos en la presente investigación, se empleó concentraciones más bajas de NaOCl, D1 (1,5%, 20 min) y D2 (2 %, 15 min), donde los porcentajes de oxidación mostraron un comportamiento similar a los obtenidos por Angulo y colaboradores: D1 (15 %) y D2 (7 %), acompañados de una contaminación del 18% y 9%, respectivamente. En cuanto a la viabilidad, se observó que el uso de NaOCl al 1,5% produjo resultados favorables para los explantes, similares a los reportados por **Tejada et al., (2022)** que en su estudio emplearon NaOCl al 1,5% en varias variedades de arándanos, obteniendo una viabilidad del 86,67% (Biloxi) y 93,33% (Bluecrop). Es importante considerar que los resultados pueden variar debido a la adición de otro agente desinfectante ($HgCl_2$ 0,1%) y al tiempo de inmersión.

La viabilidad de los explantes tratados con una concentración del 2% de NaOCl, se observó un 91% de viabilidad. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por **Angulo et al., (2022)**, quienes lograron un 99,65% de viabilidad al trabajar con explantes de *Melia azedarach* L. Es importante destacar que la diferencia en los porcentajes de viabilidad puede atribuirse al uso de diferentes agentes desinfectantes (NaOCl y $H_2O_2$). En nuestro estudio, se empleó únicamente NaOCl. La naturaleza de estos resultados está directamente relacionada con el genotipo de la variedad, la concentración de agentes desinfectantes y los tiempos de inmersión, lo que subraya la obtención de resultados más favorables con concentraciones bajas de NaOCl.

La baja oxidación se tradujo en una elevada viabilidad de los explantes pues la oxidación daña y altera las funciones celulares de material vegetal comprometiendo negativamente su capacidad de supervivencia, regeneración órganos **(Zhang et al., 2015).** Las moléculas ROS en la etapa de regeneración vegetal pueden provocar una nula o menor tasa de respuesta vegetal ya sea en la inducción de callo, raíces u de otro órgano **(Gammoudi et al., 2022).**

### 3.2 Medios de cultivo efectivos para la estimulación celular de explantes de *Vaccinium corymbosum* L. cultivar Biloxi

En la Tabla 6 se presentan los resultados de las variables respuesta después de 3 semanas, tales como el número de hojas y la longitud del brote, utilizando dos tipos de medios de cultivo: MS (Medio Murashige y Skoog) y WPM (Woody Plant Medium).

**Tabla 6.**

Número de hojas y longitud del brote en los explantes de *Vaccinium corymbosum* L. cultivar Biloxi en el transcurso de la segunda, cuarta y sexta semana.

| Tratamientos | Semana 2 | | Semana 4 | | Semana 6 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N° hojas | Longitud del brote (cm) | N° hojas | Longitud del brote (cm) | N° hojas | Longitud del brote (cm) |
| **T0 Control (-)** | - | - | - | - | - | - |
| **T1 (MS-D1-ANA)** | 0 | 0,006 | 1 | 0,124 | 2 | 0,476 |
| **T2 (MS-D1-AIB)** | 2 | 0,416 | 5 | 0,604 | 7 | 1,132 |
| **T3 (MS-D2-ANA)** | 0 | 0,044 | 2 | 0,248 | 5 | 0,508 |
| **T4 (MS-D2-AIB)** | 2 | 0,160 | 2 | 0,372 | 5 | 0,692 |
| **T5 (WPM-D1-ANA)** | 1 | 0,107 | 3 | 0,284 | 6 | 0,588 |
| **T6 (WPM-D1-AIB)** | 3 | 0,544 | 6 | 1,060 | 8 | 1,332 |
| **T7 (WPM-D2-ANA)** | 0 | 0,040 | 2 | 0,236 | 4 | 0,428 |
| **T8 (WPM-D2-AIB)** | 5 | 0,676 | 9 | 2,116 | 13 | 3,288 |

**Nota:** Medio Murashige y Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM), Desinfección 1 (D1), Desinfección 2 (D2), ácido naftalenacético (ANA), ácido indol indolbutírico (AIB).

El tratamiento que mostró mayor estimulación celular en términos de longitud del brote y número de hojas fue el T8 (WPM-D2-AIB), el cual registró una media de 13 hojas y una longitud de brote de 3,288 cm. En contraste, el tratamiento con la menor cantidad de hojas fue el T1 (MS-D1-ANA), con una media de 2 hojas, mientras que el T7 (WPM-D2-ANA) presentó la menor longitud de brote, con un valor de 0,428 cm, como se muestra en las Figuras 4, 5 y 6. Los controles utilizados fueron agar sin medio de cultivo: AGAR-ANA-D1, AGAR-ANA-D2, AGAR-AIB-D1 y AGAR-AIB-D2.

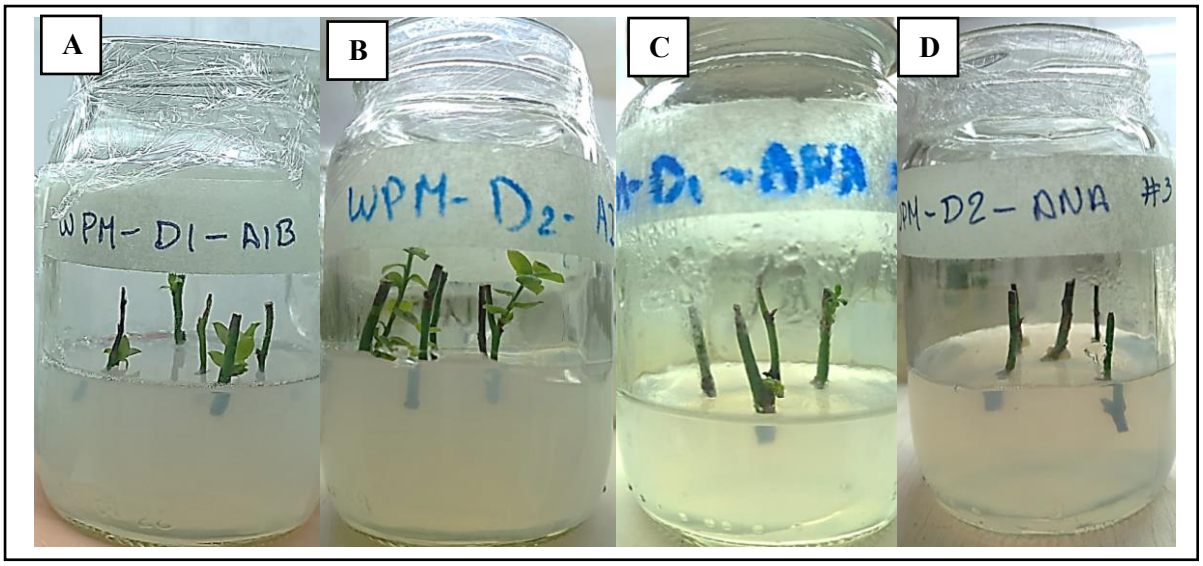



**Figura 4.** Tratamientos con medio de cultivo WPM (Tercera Semana).

**Nota:** Tratamientos A) WPM-D1-AIB, B) WPM-D2-AIB, C) WPM-D1-ANA, D) WPM-D2-ANA.

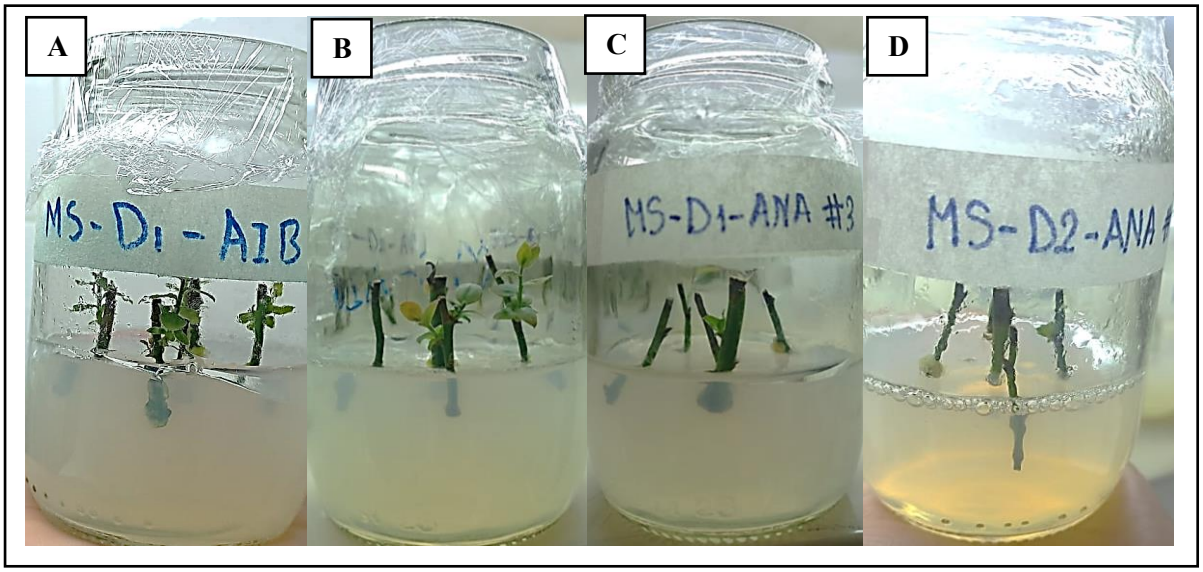



**Figura 5.** Tratamientos con medio de cultivo MS (Tercera semana).

**Nota:** Tratamientos A) MS-D1-AIB, B) MS-D2-AIB, C) MS-D1-ANA, D) MSA-D2-ANA.

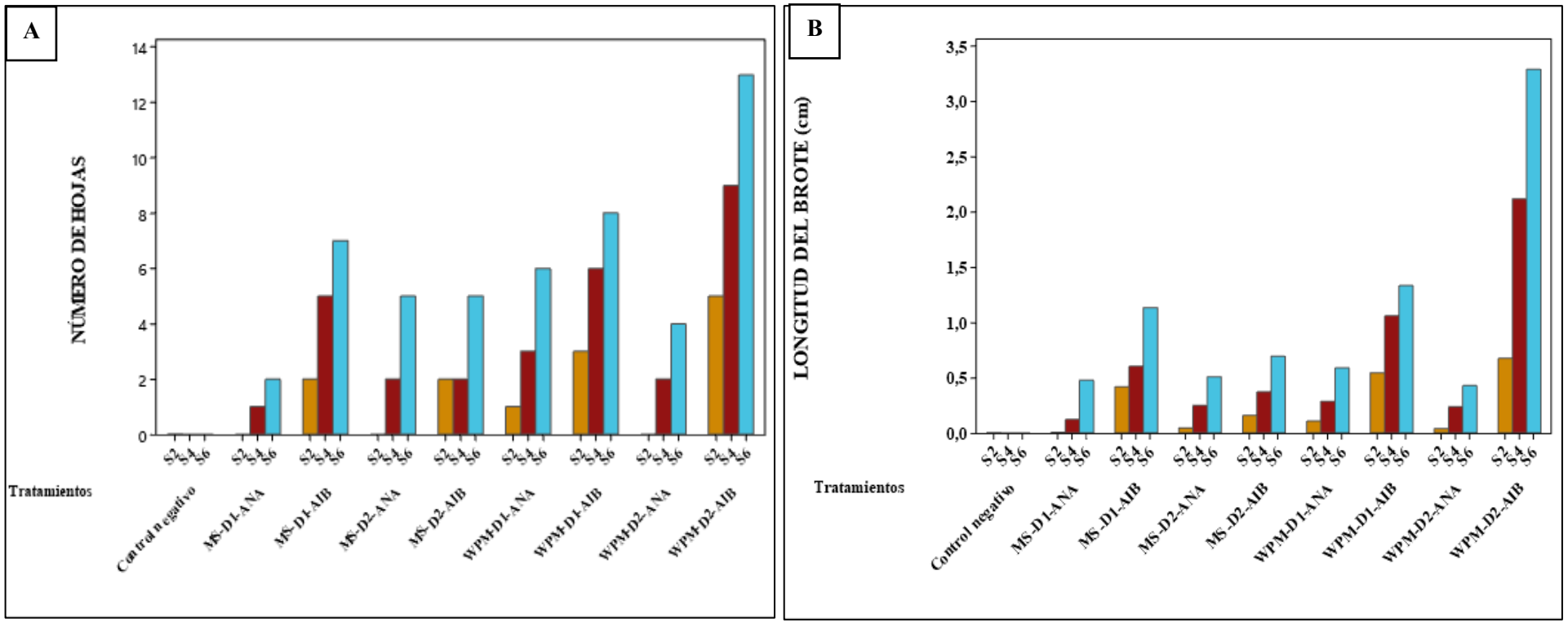



**Figura 6.** Desarrollo de hojas y altura de los brotes en los diferentes tratamientos biológicos a la segunda semana, cuarta semana y sexta semana después de la siembra de explantes.

**Nota:** A) Número de hojas, B) Longitud de brote. Semana 2 (S2), Semana 4 (S4), Semana (S6), Medio Murashige y Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM), Desinfección 1 (D1), Desinfección 2 (D2), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB).

Durante un período de dos, cuatro y seis semanas, se registraron resultados positivos en tratamientos combinados con dos medios de cultivo, MS y WPM. Se evidenció un avance en el número de hojas y en la longitud de los brotes, mostrando un desarrollo progresivo de los explantes con el tiempo. Especialmente notable fue el incremento observado a la sexta semana, donde el tratamiento WPM-D2-AIB sobresalió en términos de número de hojas y longitud del brote. Además, se subraya la relevancia de los medios de cultivo en el desarrollo vegetal, dado que los controles no evidenciaron crecimiento alguno durante las seis semanas. Los datos correspondientes a la sexta semana se ilustran en la Figura 7, facilitando la visualización de las variables de respuesta.

Se aplicó el análisis de varianza ANOVA a la variable respuesta, número de hojas (Anexos 9 y 10), identificando diferencias significativas entre los tratamientos. Mediante la prueba de Tukey, se clasificaron los datos en tres categorías (A, B, C) según sus diferencias significativas. En la categoría A, el tratamiento WPM-D2-AIB presentó una media de 13 hojas, en contraste con la categoría C, donde el tratamiento MS-D2-ANA mostró la media más baja con 2 hojas. Por otro lado, los tratamientos de la categoría C mostraron similitudes con los de la categoría A. Respecto a la longitud del brote, se establecieron dos categorías: el grupo A incluyó al tratamiento WPM-D2-AIB con una media más alta de 3,288 cm, y el grupo B englobó tratamientos con medias menores. Tratamientos como WPM-D1-AIB, MS-D1-AIB, MS-D2-AIB, WPM-D1-ANA, MS-D2-ANA, MS-D1-ANA y WPM-D2-ANA no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero sí con respecto al tratamiento WPM-D2-AIB. No obstante, los resultados de la sexta semana indicaron que los tratamientos con medio WPM lograron un promedio superior tanto en número de hojas con 8 como en longitud de brote con 1,409 cm; mientras que los tratamientos con medio MS mostraron resultados inferiores en estas métricas, con un promedio de 5 hojas y una longitud de brote de 0,702 cm. Esto sugiere que el medio WPM es más adecuado para plantas leñosas.

En tratamientos combinados con el medio Murashige y Skoog (MS), se observó un crecimiento significativo, aunque lento (Figura 7), en el número de hojas y la longitud de los brotes**. Phillips & Garda (2019)** mencionan que este fenómeno pudo atribuirse a la elevada concentración de nitrógeno en forma de nitrato y amonio, que ralentiza y perjudica el desarrollo y metabolismo de los tejidos vegetales en los medios de cultivo. Dichas concentraciones elevadas disminuyen el potencial osmótico del medio, lo que restringe la hidratación óptima de los brotes e impide la absorción adecuada de agua y nutrientes **(Campos et al., 2020).**

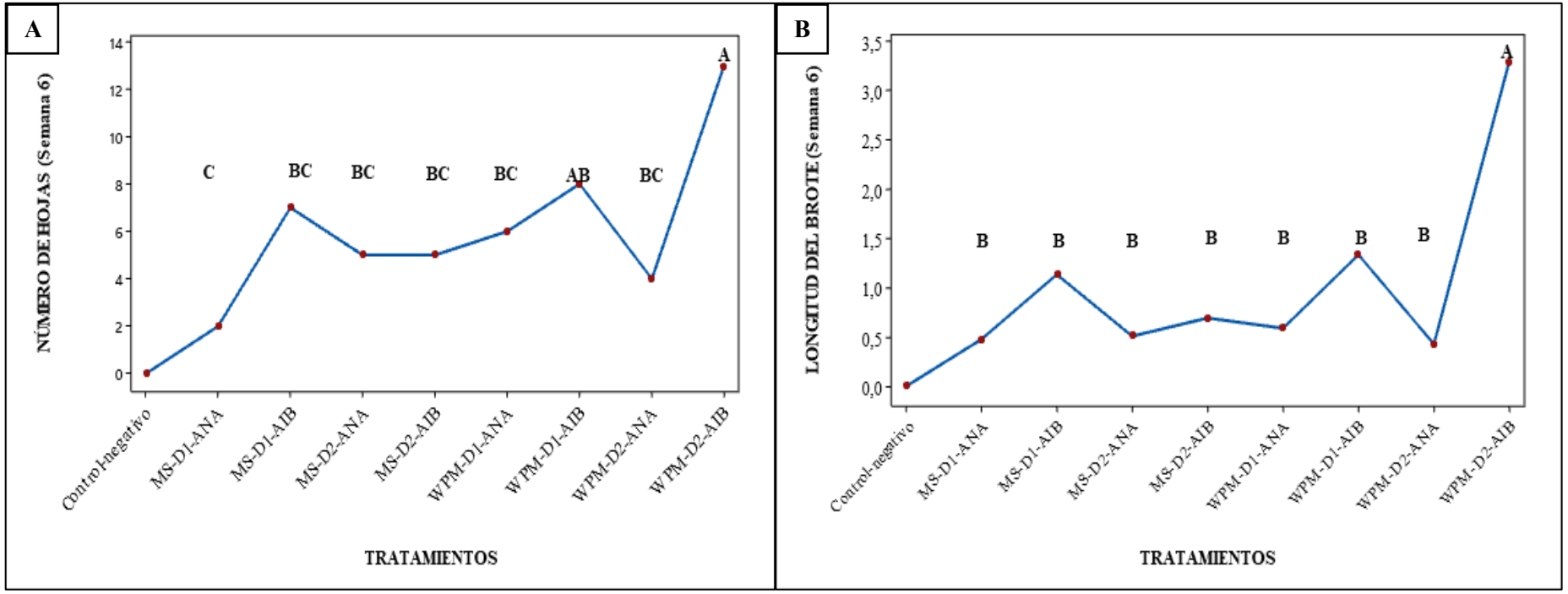



**Figura 7.** Desarrollo de hojas y longitud de brotes en los diferentes tratamientos biológicos a la sexta semana después de la siembra de explantes.

**Nota:** A) Número de hojas B) Longitud de brotes. Las letras A, B, C sobre las columnas indican grupos de datos con diferencias significativas (Tukey's HSD $p < 0,05$).

Los resultados obtenidos con el medio WPM resaltaron por su eficiencia en cuanto al número de hojas y longitud del brote. Este medio es reconocido como óptimo para la micropropagación de plantas leñosas, como el arándano **(Tetsumura et al., 2008)**. Está compuesto por sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) o nitrato de amonio ($NH_4NO_3$) como fuente de nitrógeno (N). Otros medios contienen la fuente de N como un compuesto individual, lo cual puede afectar el pH del medio y la zona intracelular de los explantes, provocando inhibición morfogenética **(Ramage & Williams, 2002)**. Esta diferencia en la composición del nitrógeno resulta en una respuesta celular más baja, aunque también es importante considerar el genotipo vegetal **(Phillips & Garda, 2019)**.

Además, **Phillips & Garda (2019)** junto con **Correia et al. (2024)** señalan que el contenido total de nitrógeno (N) y nitrato de amonio ($NH_4NO_3$) en el medio WPM es menor en comparación con el medio Murashige y Skoog (MS). De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó un crecimiento lento en hojas y brotes. Los estudios indican que este retraso se debe a la elevada concentración de nitrógeno, la cual afecta los procesos fisiológicos importantes como la fotosíntesis y la diferenciación celular **(Wada et al., 2015)**.

**Campos y sus colaboradores (2020),** en su estudio resalta el medio WPM como el más eficiente para el cultivo *in vitro* de caoba, registrando un máximo de 5 hojas y una longitud del brote de 7,20 mm a los 50 días del cultivo. Estas observaciones surgieron al comparar los resultados obtenidos al emplear medios MS, WPM y HLM (High Linght Medium). Estos hallazgos contrastan con los obtenidos en este trabajo, donde se registró una tasa máxima de 13 hojas y una longitud de brote de 3,288 cm después de 50 días. Por otro lado, el medio MS no fue tan satisfactorio para el desarrollo de órganos vegetales. En cultivos de plantas leñosas se recomienda comúnmente usar ½ MS; sin embargo, en este trabajo se utilizó MS completo, caracterizado por su alta concentración de sales. Esta alta concentración puede ser problemática para plantas leñosas, ya que tienden a mostrar fitotoxicidad ante niveles elevados de sales, como sugieren **Phillips & Garda (2019).**

### 3.3 Fitohormonas ANA y AIB como inductores de enraizamiento de explantes de *Vaccinium corymbosum* L. cultivar Biloxi

Los resultados del porcentaje de enraizamiento a las seis semanas se presentan en la Tabla 7, donde se ilustran los efectos de la aplicación de dos fitohormonas: ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB).

**Tabla 7.**

Porcentajes de enraizamiento de los diferentes tratamientos biológicos.

| Tratamientos | Porcentajes de enraizamiento | Número de raíces | Longitud de raíz (cm) |
|---|---|---|---|
| **T1(WPM-D2-AIB)** | 84,00$^{A}$ | 11,76 | 3,24 |
| **T2(WPM-D1-AIB)** | 64,00$^{AB}$ | 8,69 | 2,43 |
| **T3(WPM-D2-ANA)** | 60,00$^{AB}$ | 8,07 | 1,32 |
| **T4(MS-D2-AIB)** | 60,00$^{AB}$ | 8,38 | 1,55 |
| **T5(WPM-D1-ANA)** | 56,00$^{AB}$ | 7,13 | 0,89 |
| **T6(MS-D1-AIB)** | 52,00$^{AB}$ | 7,00 | 1,44 |
| **T7(MS-D2-ANA)** | 48,00$^{AB}$ | 6,20 | 1,27 |
| **T8(MS-D1-ANA)** | 36,00$^{B}$ | 4,77 | 0,77 |

**Nota:** Las letras A y B sobre los porcentajes indican grupos de datos con diferencias significativas (Tukey's HSD $p < 0,05$).

El análisis estadístico ANOVA (Anexo 11) reveló diferencias significativas entre los distintos tratamientos con fitohormonas. La prueba de Tukey al 5% identificó dos grupos de datos (A y B). El grupo A incluyó los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5, T6 y T7, mientras que el grupo B estuvo compuesto por los tratamientos T2, T3, T4, T5, T6, T7 y T8. Los tratamientos T1 (WPM-D2-AIB) y T8 (MS-D1-ANA) mostraron diferencias estadísticas significativas, siendo el tratamiento T1 el que presentó un promedio de enraizamiento superior del 84%.

El ácido indolbutírico (AIB) facilita el enraizamiento adventicio en esquejes de plantas leñosas **Ríos et al. (2022)**, resalta su eficacia debido a la conversión de AIB a ácido indol-3-acético (AIA), que está directamente relacionado con la expansión celular en la raíz y los pelos radiculares. Además, se ha observado la presencia de óxido nítrico peroxisomal, que también promueve el desarrollo radicular **(Khan et al., 2023; Pincelli et al., 2024)**. Una hipótesis sugiere que el nivel de enraizamiento está vinculado a la estructura tisular de los tallos; por ejemplo, se cree que el desarrollo de raíces comienza por la desdiferenciación de células en la zona del parénquima cortical como respuesta al corte para la extracción de explantes **(Santos et al., 2024).**

La fitohormona AIB ha mostrado una mejor tasa de enraizamiento en explantes, coincidiendo con el estudio de **Harutyunyan et al., (2022),** donde explantes de *Vaccinium myrtillus y Vaccinium uliginosum* alcanzaron un 96,1% de enraizamiento con 1,5 mg/L de AIB en medio MS, con longitudes de raíces de hasta 48 mm y un promedio de 5-7 raíces por explante. **Le y sus colaboradores (2023)**,

trabajaron con un híbrido *Vaccinium* cv. Blue Suede, que alcanzó un 90% de enraizamiento tras la aplicación de 0,5 mg/L de AIB en el medio ½ WPM. De igual manera en el estudio de **Guo et al., (2019)**, se trabajó con tres cultivares de *V. corymbosum* 'Ozarkblue', 'Sierra' y 'Weiwa Kuahuat' con el medio de cultivo ½ WPM suplementado con las concentraciones de AIB de 0,1 – 2 mg/L, la mayor tasa de enraizamiento para el cultivar ' Ozarkblue' fue del 97,7% con 0,1 mg/L AIB con lo que se evidenció un promedio de 6,5 en número de raíces y en cuanto a longitud estas alcanzaron un valor de 3,5 cm. Para el cultivar 'Weiwa Kuahuat' se evidenció una tasa de enraizamiento del 84% bajo la suplementación de 0,5 mg/L de AIB, este cultivar se caracterizó por expresar 3 raíces en promedio con una longitud promedio de 3 cm. Por último, el cultivar 'Sierra' denotó la mayor tasa de enraizamiento con un 100% y acompañada con una media de 5,9 en número de raíces y una longitud de 3,9 cm. Estos resultados apoyan la afirmación de **Zhou y colaboradores (2023)**, sobre la independencia genotípica de las respuestas de enraizamiento.

La baja tasa de enraizamiento observada con la fitohormona ácido naftalenacético (ANA) fue inesperada, ya que existen reportes de altos índices de enraizamiento en estudios anteriores. Por ejemplo, **Zhou y colaboradores (2023)**, emplearon 2 mg/L de la fitohormona ANA y alcanzaron una tasa de enraizamiento del 90%. Sin embargo, no especificaron el cultivar de arándano utilizado, lo que podría influir en los resultados y limitar la comparación con este estudio. Cada variedad responde de manera distinta a las fitohormonas, como demostró **Meneses et al. (2022)** quienes lograron un 60% de enraizamiento en *Vaccinium floribundum* con 2 mg/L de ANA, promediando 4,50 raíces por planta y una longitud de 8,10 mm. En el caso de los datos obtenidos en este trabajo, con una concentración menor de 1,5 mg/L de ANA, se obtuvo resultados similares, entre el 56% y el 60%, sugiriendo que una menor concentración podría ser suficiente para obtener resultados comparables. A pesar de los resultados positivos, la fitohormona no fue tan eficiente como se esperaba a concentraciones reducidas.

En la sexta semana, los datos presentados en la Tabla 7 y representados en la Figura 8 muestran diferencias significativas en el porcentaje de enraizamiento entre tratamientos. El tratamiento MS-D1-ANA ($^{A}$) tuvo el nivel más bajo con un 36%, mientras que el tratamiento WPM-D2-AIB ($^{B}$) alcanzó el mayor porcentaje con un 84%. Los índices A y B indican diferencias estadísticamente significativas entre los datos.

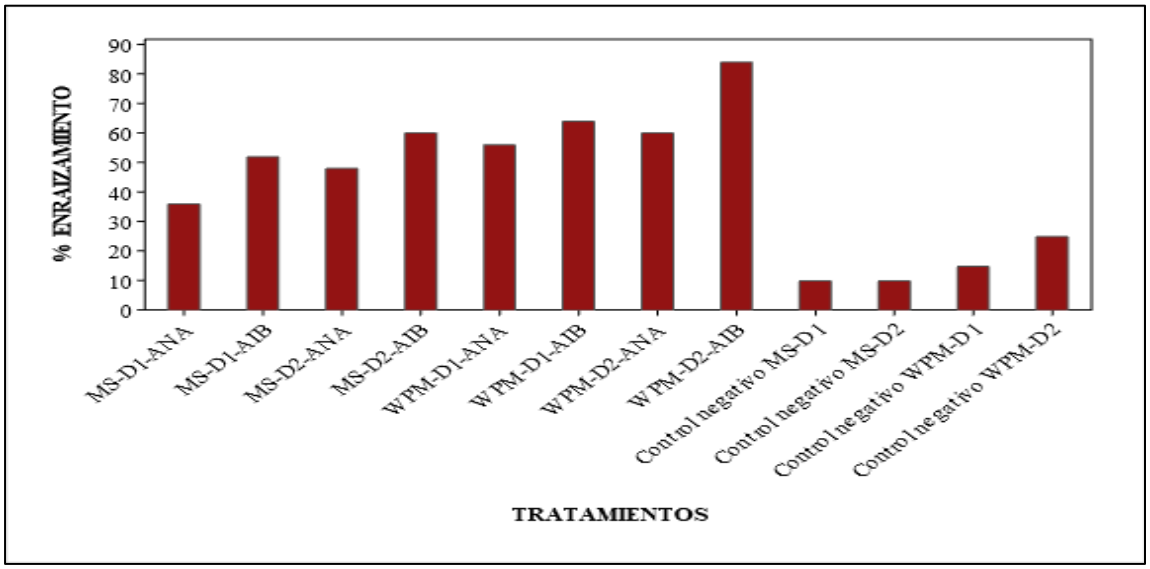



**Figura 8.** Porcentaje de enraizamiento de arándano Biloxi en diferentes tratamientos biológicos.

**Nota:** La Figura muestra los porcentajes de enraizamiento de los explantes al ser combinados con diferentes medios (MS y WPM), desinfección (D1 y D2) y fitohormonas (AIB y ANA) que estimulan el enraizamiento.

En cuanto al medio WPM, su eficacia se pudo deber a las cantidades óptimas de sales que en sinergia con la fitohormona AIB, promovieron la formación de hojas, la elongación de brotes y el desarrollo de raíces (Figura 9). La Figura 10 por su parte, corroboró los resultados previamente mencionados, indicando que el mejor tratamiento corresponde a la combinación del tratamiento con hipoclorito de sodio al 2% (D2), el medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) y la fitohormona AIB. Esto se atribuye a que D2 reduce de manera significativa los focos de contaminación.

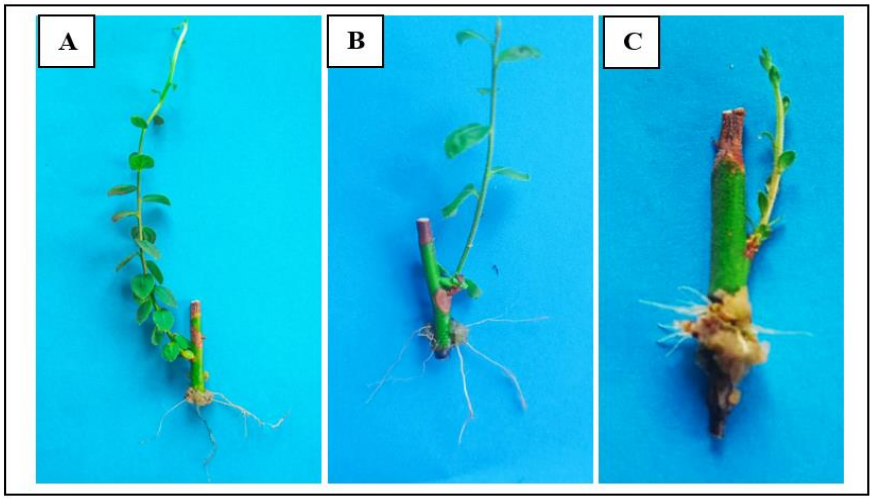



**Figura 9.** Raíces desarrolladas de los explantes de arándanos.

**Nota.** A) tratamiento WPM-D2-AIB, B) tratamiento WPM-D1-AIB, C) tratamiento MS-D1-ANA.

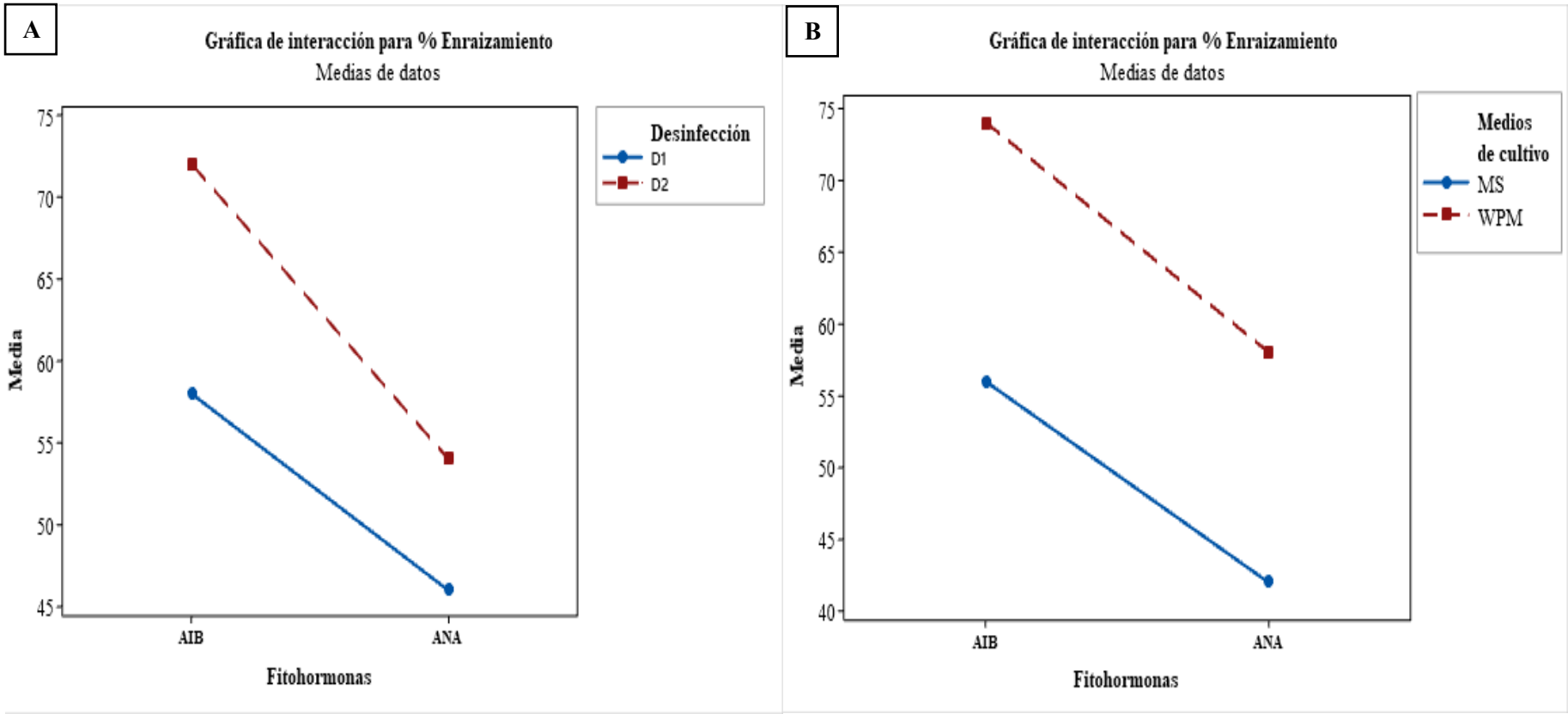



**Figura 10.** Gráficas de interacción entre tratamientos de desinfección, medios de cultivo y fitohormonas.

**Nota:** A) fitohormonas ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA) vs desinfección 1 (D1), desinfección 2 (D2). B) fitohormonas ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA) vs medio Murashige y Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM).

# CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 4.1 Conclusiones

- El tratamiento más efectivo para la desinfección de los explantes internodales de *Vaccinium corymbosum* L. cultivar Biloxi fue el D2. Este consistió en el uso de hipoclorito de sodio al 2% durante 15 minutos, resultando en una presencia microbiana del 9%, lo cual demuestra una eliminación eficaz de los focos de contaminación. Además, este tratamiento presentó una mínima oxidación del 7% y mantuvo una viabilidad del 91%, indicando que el hipoclorito de sodio al 2% no afectó la viabilidad del material vegetal.
- Los resultados obtenidos indican que el medio de micropropagación más efectivo para *Vaccinium corymbosum* L. cultivar Biloxi es el WPM. Se evidenció que, durante un periodo de dos, cuatro y seis semanas, se registró un avance significativo en el número de hojas y en la longitud de los brotes.
- La fitohormona con mayor inducción de enraizamiento fue el ácido indolbutírico (AIB) a una concentración de 1,5 mg/L en donde a la sexta semana se obtuvo un 84 % de enraizamiento, con un número de raíces de 11,76 por explante y un promedio de 3,24 cm en cuanto a la longitud de raíces.
- El proceso de enraizamiento *in vitro* óptimo para arándanos involucra el uso del medio de cultivo WPM, la hormona AIB a una concentración de 1,5 mg/L y una desinfección con hipoclorito de sodio al 2% durante 15 minutos. Estos parámetros han demostrado ser efectivos para obtener un enraizamiento adecuado, facilitando el posterior traspaso a sustrato y la micropropagación eficiente de plantas de arándano.

## 4.2 Recomendaciones

- La aparición prematura de callos retrasa la formación de raíces. Por tal motivo, se recomienda que los callos sean retirados de los explantes inmediatamente después de su aparición.

- Se recomienda que el fotoperiodo sea constante y controlado, ya que la intermitencia de este genera estrés abiótico en las plantas y, como consecuencia, alteraciones en su fisiología.

- Realizar un mantenimiento en los filtros de las cámaras de seguridad biológica, ya que puede representar un foco de contaminación.

**Bibliografía**


Aazami, M., Rasouli, F., & Ebrahimzadeh, A. (2021). Oxidative damage, antioxidant mechanism and gene expression in tomato responding to salinity stress under *in vitro* conditions and application of iron and zinc oxide nanoparticles on callus induction and plant regeneration. *BMC Plant Biology*, *21*(1), 597-620. https://doi.org/10.1186/s12870-021-03379-7

Abdalla, N., Ramady, H., Seliem, M., Mahrouk, M., Taha, N., Bayoumi, Y., Shalaby, T., & Dobránszki, J. (2022). An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae*, *8*(8), 667-705. https://doi.org/10.3390/horticulturae8080677

Agrocalidad. (2022). *Ecuador entra a competir en el mercado internacional de arándanos.* Agrocalidad. https://www.agrocalidad.gob.ec/ecuador-entra-a-competir-en-el-mercado-internacional-de-arandanos/

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

Ahmadpoor, F., Zare, N., Asghari, R., & Sheikhzadeh, P. (2022). Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolites production in *in vitro* cultures *Melia azedarach* L. *AMB Express*, *12*(1), 3-15. https://doi.org/10.1186/s13568-022-01343-8

Akimova, S., Radzhabov, A., Esaulko, A., Samoshenkov, E., Nechiporenko, I., Kazakov, P., Voskoboinikov, Y., Matsneva, A., Zubkov, A., & Aisanov, T. (2022). Improvement of Ex Vitro Growing Completion of Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in Containers. *Forests, 13*(10), 1550-1569. https://doi.org/10.3390/f13101550

Alvarado, J., Meléndez, J., Vilca, N., Huaman, E., Lapiz, Y., Neri, J., Prat, M., & Oliva, M. (2022). Optimizing factors influencing micropropagation of “Bluecrop” and “Biloxi” blueberries and evaluation of their morpho-physiological characteristics during ex vitro acclimatization. *Journal of Berry Research*, *12*(3), 347- 364. https://doi.org/10.3233/JBR-211565

Angulo, B., Castillo, R., & Alpizar, L. (2015). Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (*Vaccinium* spp*.)* a partir de segmentos foliares de dos procedencias. *Agronomía Costarricense*, *39*(1), 7-23. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242015000100001

Aonofriesei, F. (2022). Polysorbate 21 Can Modulate the AntAIBcterial Potential of Two Pyrazol Derivatives. *Biomolecules, 12*(12), 1819-1835. https://doi.org/10.3390/biom12121819

Arencibia, A., Vergara, C., Quiroz, K., Carrasco, B., Bravo, C., & Garcia-Gonzales, R. (2013). An Approach for Micropropagation of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Plants Mediated by Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *American Journal of Plant Sciences*, *4*(05), 1022–1028. https://doi.org/10.4236/ajps.2013.45126

Azofeifa, Á. (2008). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, *20*(1), 153-175. https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990

Bannoud, F., & Bellini, C. (2021). Adventitious Rooting in Populus Species: Update and Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, *12* (1),124-146 . https://doi.org/10.3389/fpls.2021.668837

Basiry, D., Entezari, N., Uluseker, C., Kaster, K., Kommedal, R., & Pala, I. (2022). The effect of disinfectants and antiseptics on co- and cross-selection of resistance to antibiotics in aquatic environments and wastewater treatment plants. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1-27 https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1050558

Bettoni, J., Wang, M. & Wang, Q. (2024). *In Vitro* Regeneration, Micropropagation and Germplasm Conservation of Horticultural Plants. *Horticulturae 10* (1), 45-50. https://doi.org/10.3390/horticulturae10010045

Bidabadi, S., & Mohan, J. (2020). Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. *Plants, 9* (6), 702-722. https://doi.org/10.3390/plants9060702

Binder, B. (2020). Ethylene signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(22), 7710–7725. https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.010854

Blaacutezquez, M., Nelson, D., & Weijers, D. (2020). Evolution of Plant Hormone Response Pathways. *Annual Review of Plant Biology, 71*(1), 327-353. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100309

Budău, R., Bei, M., Onet, C., Agud, E., Mintas, O., Timofte, A., Rosan, C., Laslo, V., & Vicas, S. (2023). *In Vitro* Propagation of Several Valuable Selections of Robinia pseudoacacia L. as a Fast and Sustainable Source for Wood Production. *Sustainability*, *15*(21), 15243-15258. https://doi.org/10.3390/su152115243

Bujor, O., Tanase, C., & Popa, M. (2019). Phenolic Antioxidants in Aerial Parts of Wild *Vaccinium* Species: Towards Pharmaceutical and Biological Properties. *Antioxidants*, *8*(12), 649-662. https://doi.org/10.3390/antiox8120649

Bull, T., & Michelmore, R. (2022). Molecular Determinants of *in vitro* Plant Regeneration: Prospects for Enhanced Manipulation of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, *13*, 888425. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.888425

Campos, J., Arteaga, M., Chico, J., Cerna, L., & Campos, S. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación *in vitro* de "caoba" Swietenia macrophylla King (Meliaceae). *Arnaldoa*, *27*(1), 141–156. https://doi.org/10.22497/ARNALDOA.271.27107

Cepeda, J. (2023). Optimización del protocolo de micropropagación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) var. Biloxi a partir de segmentos nodales [Trabajo de titulación, Universidad Técnica de Ambato]. https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/37876/1/BQ%20345.pdf

Chen, K., Li, G., Bressan, R., Song, C., Zhu, J., & Zhao, Y. (2020). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology, 62*(1), 25-54. https://doi.org/10.1111/jipb.12899

Correia, S., Matos, M., & Leal, F. (2024). Advances in Blueberry (*Vaccinium* spp*.) In vitro* Culture: A Review. *Horticulturae*, *10*(6), 533-554. https://doi.org/10.3390/horticulturae10060533

Delgado, G., Vásquez, C., Esquerre, B., Bazán, P., & Rojas, C. (2021). *In vitro* tissue culture in plants propagation and germplasm conservation of economically important species in Peru. *Scientia Agropecuaria*, *12*(3), 337-349. https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.037

FAOSTAT, 2022. Valor de la producción Agrícola. https://www.fao.org/faostat/es/#data/QV/visualize

Farooq, M., Niazi, A., Akhtar, J., Saifullah, R. Farooq, M., Souri, Z., Karimi, N., & Rengel, Z. (2019). Acquiring control: The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiology and Biochemistry*, *141*, 353–369. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.039

Federación Ecuatoriana de Productores y Exportadores de Arándano [FEPEXA], 2021. Arándano un cultivo en crecimiento. FEPEXA. https://www.fepexa.org.ec/arandano.html

Filiz, E., Ozyigit, I., Saracoglu, I., Uras, M., Sen, U., & Yalcin, B. (2019). Abiotic stress-induced regulation of antioxidant genes in different Arabidopsis ecotypes: microarray data evaluation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *33*(1), 128–143. https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1556120

Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science, 11*(4), 147-157. https://doi.org/10.4265/bio.11.147

Gammoudi, N., Nagaz, K., & Ferchichi, A. (2022). Establishment of optimized *in vitro* disinfection protocol of Pistacia vera L. explants mediated a computational approach: multilayer perceptron–multi−objective genetic algorithm. *BMC Plant Biology*, *22*(1), 324. https://doi.org/10.1186/s12870-022-03674-x

García, J., Briones, A., & Blázquez, M. (2021). Origin and evolution of gibberellin signaling and metabolism in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology, 109*, 46-54 https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.04.009

Giacobbo, C., Fischer, D., Fischer, C., Fischer, L., Galina, J., & Damis, R. (2023). Rooting of semi-hardwood blueberry mini-cuttings from different cultivars from the highbush and rabbiteye groups. *Scientific Electronic Archives*, *16*(2), 9-14. https://doi.org/10.36560/16220231667

Gomes, B., & Scortecci, K. (2021). Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant Biology, 23*(6), 894-904. https://doi.org/10.1111/plb.13303

González, E., Calderón, M., Barros, J., & Ragazzo, J. (2021). Evaluation of biopolymers in the encapsulation by electrospraying of polyphenolic compounds extracted from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) variety Biloxi. *Polymer Bulletin*, *78*(7), 3561-3576. https://doi.org/10.1007/s00289-020-03292-3

Govindaraju, A. B., Christas, K. M., Kowsalya, E., Ramesh, M., Sohn, S.-I., & Pandian, S. (2022). Improved sterilization techniques for successful in vitro micropropagation. In S. Gupta & P. Chaturvedi (Eds.), *Commercial scale tissue culture for horticulture and plantation crops* (pp. 1-21). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-19-0055-6_1

Guamán, J. (2022). *Establecimiento de segmentos nodales de Vaccinium corymbosum L. (Var. Emerald), en dos medios de cultivo mediante el manejo de factores del ecosistema in vitro* [Trabajo de titulación, Universidad Técnica de Ambato]. https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/36532/1/Tesis-331%20%20Ingenier%c3%ada%20Agron%c3%b3mica%20-%20Guam%c3%a1n%20Quispe%20Jos%c3%a9%20Manuel.pdf

Guo, Y., Zhao, Y., Zhang, M., & Zhang, L. (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), 615–620. https://doi.org/10.1007/s11240-019-01702-7

Hajare, S., Chauhan, N., & Kassa, G. (2021). Effect of Growth Regulators on *in vitro* Micropropagation of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Gudiene and Belete Varieties from Ethiopia. *The Scientific World Journal*, *2021* (1), 5928769. https://doi.org/10.1155/2021/5928769

Hameg, R., Arteta, T., Landin, M., Gallego, P., & Barreal, M. (2020). Modeling and Optimizing Culture Medium Mineral Composition for *in vitro* Propagation of *Actinidia arguta*. *Frontiers in Plant Science*, *11*(1), 554905. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.554905

Harutyunyan, Z., Vardanian, I., Hoveyan, Z., Avagyan, A., & Hakobyan, A. (2022). Biotechnology methods in study of *Vaccinium uliginosum* L. and *Vaccinium myrtillus* L. in Armenia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *1045*(1), 012149. https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/1045/1/012149

Hasnain, A., Naqvi, S., Ayesha, S., Khalid, F., Ellahi, M., Iqbal, S., Hassan, M., Abbas, A., Adamski, R., Markowska, D., Baazeem, A., Mustafa, G., Moustafa, M., Hasan, M., & Abdelhamid, M. (2022). Plants *in vitro* propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. *In Frontiers in Plant Science, 13*, 1009395. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395

Hazubska, T. (2019). Propagation of Juniper species by plant tissue culture: A mini-review. *Forests. 10*(11), 1028-1045. https://doi.org/10.3390/f10111028

Hesami, M., Adamek, K., Pepe, M., & Jones, A. (2023). Effect of Explant Source on Phenotypic Changes of *In vitro* Grown Cannabis Plantlets over Multiple Subcultures. *Biology*, *12*(3), 443-456. https://doi.org/10.3390/biology12030443

Hine, A., & Abdelnour, A. (2013). Establecimiento *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L). *Tecnología En Marcha*, *26*(4), 64-71. https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4835416

Huang, F., Marungruang, N., Martinsson, I., Camprubí Ferrer, L., Nguyen, T., Gondo, T., Karlsson, E. N., Deierborg, T., Öste, R., & Heyman, L. (2023). A mixture of Nordic berries improves cognitive function, metabolic function and alters the gut microbiota in C57Bl/6J male mice. *Frontiers in Nutrition*, *10*(2), 1257472. https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1257472

Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development*, *143*(9), 1442–1451. https://doi.org/10.1242/dev.134668

Jafari, M., Daneshvar, M., Jafari, S., & Hesami, M. (2022). Machine Learning-Assisted *In vitro* Rooting Optimization in *Passiflora caerulea*. *Forests*, *13*(12). 1-12. https://doi.org/10.3390/f13122020

Jawale, S., Zargad, V., Tarde, S., Shinde, A., & Musmade, D. (2020). Plant tissue culture. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, *7*(11), 229-239. https://www.jetir.org/view?paper=JETIR2011037

Jones, I., & Joshi, L. (2021). Biocide Use in the Antimicrobial Era: A Review. *Molecules*, *26*(8), 2276-2287. https://doi.org/10.3390/molecules26082276

Kalt, W., Cassidy, A., Howard, L., Krikorian, R., Stull, A., Tremblay, F., & Zamora-Ros, R. (2020). Recent Research on the Health Benefits of Blueberries and Their Anthocyanins. *Advances in Nutrition, 11*(2), 224–236. https://doi.org/10.1093/advances/nmz065

Karapatzak, E., Dichala, O., Ganopoulos, I., Karydas, A., Papanastasi, K., Kyrkas, D., Yfanti, P., Nikisianis, N., Fotakis, D., Patakioutas, G., Maloupa, E., & Krigas, N. (2022). Molecular Authentication, Propagation Trials and Field Establishment of Greek Native Genotypes of *Sambucus nigra* L. (Caprifoliaceae): Setting the Basis for Domestication and Sustainable Utilization. *Agronom*y, *12*(1), 114-138. https://doi.org/10.3390/agronomy12010114

Kaur, K., Dolker, D., Behera, S., & Pati, P. (2022). Critical factors influencing *in vitro* propagation and modulation of important secondary metabolites in *Withania somnifera* (L.) dunal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 149*, 41-60. https://doi.org/10.1007/s11240-021-02225-w

Khan, M., Ali, S., Al, T., & Yun, B. (2023). Nitric Oxide Acts as a Key Signaling Molecule in Plant Development under Stressful Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(5), 4782. https://doi.org/10.3390/ijms24054782

La Hora. (17 de febrero de 2023). Frutas como el arándano son una oportunidad para diversificar las exportaciones ecuatorianas y generar empleo en sectores como la Sierra Centro. *La Hora*. https://www.lahora.com.ec/pais/frutas-arandanos-diversificar-exportaciones-ecuador/

Lalthafamkimi, L., Bhattacharyya, P., Bhau, B., Wann, S., & Banik, D. (2021). Direct organogenesis mediated improvised mass propagation of Pogostemon cablin: A natural reserve of pharmaceutical biomolecules. *South African Journal of Botany*, *140*, 375–384. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.018

Lawson, J., Bridges, W., & Adelberg, J. (2023). AIB Delivery Technique and Media Salts *Affected In vitro* Rooting and Acclimatization of Eight *Prunus Genotypes*. *Plants*, *12*(2), 289-303. https://doi.org/10.3390/plants12020289

Le, K., Johnson, S., Aidun, C., & Egertsdotter, U. (2023). *In vitro* Propagation of the Blueberry 'Blue Suede™' (*Vaccinium* hybrid) in Semi-Solid Medium and Temporary Immersion Bioreactors. *Plants*, *12*(15), 2752-2765. https://doi.org/10.3390/plants12152752

Lee, H., Hirakawa, T., Yamaguchi, N., & Ito, T. (2019). The Roles of Plant Hormones and Their Interactions with Regulatory Genes in Determining Meristem Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(16), 4065-4084. https://doi.org/10.3390/ijms20164065

Llivisaca, S., Cevallos, J., Mendoza, J., Piña, F., Peralta, E., Timm, E., & Flores, J. (2020). *In vitro* Propagation of Mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, *30*(2), 167–177. https://doi.org/10.3329/ptcb.v30i2.50687

Lobos, G., & Hancock, J. (2015). Breeding blueberries for a changing global environment: A review. *Frontiers in Plant Science*, *6(*1)-782-796. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00782

López C., Vásquez M., Lancheros R., & Magnitskiy, S. (2017). Vegetative propagation of native fruit species of páramo *ThAIBudia floribunda* and *Cavendishia bracteata* by cuttings. *Agronomía Colombiana, 35*(1), 12-22. https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v35n1.61796

Malik, N., Fajer, O., Amin, L., Khalid, A., Khan, N., Bhatti, M., Munir, F., Haider, G., Amir, R., & Gul, A. (2023). Phytohormones, plant growth and development. In M. Ozturk, R. Ahmad, m. Muhammad, M. Policarpo, B. Turkyilmaz y G. Dar (Eds.), *Phytohormones and Stress Responsive Secondary Metabolites*, (pp. 175–186). Elsevier Science. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91883-1.00014-0

Mansoor, S., Ali, O., Lone, J., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A., & Ahmad, P. (2022). Reactive Oxygen Species in Plants: From Source to Sink. *Antioxidants, 11*(2), 225-239. https://doi.org/10.3390/antiox11020225

Martău, G., Bernadette, T., Odocheanu, R., Soporan, D., Bochiș, M., Simon, E., & Vodnar, D. (2023). *Vaccinium* Species (Ericaceae): Phytochemistry and Biological Properties of Medicinal Plants. *Molecules, 28*(4), 1533-1563. https://doi.org/10.3390/molecules28041533

Martini, D., Marino, M., Venturi, S., Tucci, M., Klimis, D., Riso, P., Porrini, M., & Del Bo', C. (2023). Blueberries and their bioactives in the modulation of oxidative stress, inflammation and cardio/vascular function markers: a systematic review of human intervention studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *111*(1), 109154-109178. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109154

Marzurek, M., Siekierzyńska, A., Piechowiak, T., Spinardi, A., & Litwińczuk, W. (2024). Comprehensive Analysis of Highbush Blueberry Plants Propagated *In vitro* and Conventionally. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(1), 544-562. https://doi.org/10.3390/ijms25010544

Meneses, L., Morillo, L., & Vásquez, W. (2022). *In vitro* propagation of *Vaccinium floribundum Kunth* from seeds: promissory technology for mortiño accelerated production. *Canadian Journal of Plant Science, 102*(1), 216-224. https://doi.org/10.1139/cjps-2020-0290

Mendez, D., & Abdelnour, A. (2014). Establecimiento in vitro de *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell . *Mesoamericana Kurú*, *11*(27), 3480. https://core.ac.uk/download/pdf/83115841.pdf

Mihai, R., Melo, E., Terán, V., Espinoza, I., Pinto, E., & Catana, R. (2023). The Panoramic View of Ecuadorian Soil Nutrients (Deficit/Toxicity) from Different Climatic Regions and Their Possible Influence on the Metabolism of Important Crops. *Toxics*, *11*(2), 123-144. https://doi.org/10.3390/toxics11020123

Moncousin, Ch. (1991). Rooting of *in Vitro* Cuttings: Stages of root ontogenesis. Bajaj, Y, *Biotecnología en la agricultura y la silvicultura: High-Tech and Micropropagation I*, *17*, 231-232. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-76415-8_14

Montesinos, A., Pérez, J., Cruz, A., Villafranca, M., & Herrera, R. (2023). Evaluación del efecto de la desinfección de explantes del pasto Cuba CT-115 con hipoclorito de sodio. Nota técnica. *Scielo*, *57*(34), 1- 21. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2079-34802023000100005&script=sci_arttext&tlng=es

Mosoh, D., Khandel, A., Verma, S., & Vendrame, W. (2023). Effects of sterilization methods and plant growth regulators on in vitro regeneration and tuberization in *Gloriosa superba* (L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *59*(6), 792–807. https://doi.org/10.1007/s11627-023-10387-9

Murthy, H., Joseph, K., Paek, K., & Park, S. (2023). Bioreactor systems for micropropagation of plants: present scenario and future prospects. *Frontiers in Plant Science, 14*, 1159588. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1159588

Nemzer, B., Al-Taher, F., Yashin, A., Revelsky, I., & Yashin, Y. (2022). Cranberry: Chemical Composition, Antioxidant Activity and Impact on Human Health. Overview. *Molecules*, *27*(5), 1503-1522. https://doi.org/10.3390/molecules27051503

Neves, M., Correia, S., Cavaleiro, C., & Canhoto, J. (2021). Modulation of organogenesis and somatic embryogenesis by ethylene: An overview. *Plants*, *12*(6), 1208-1238. https://doi.org/10.3390/plants10061208

Nhut, D. (2022). General Information: Some Aspects of Plants Tissue Culture In D. T. Nhut, H. T. Tung, & E. C.-T. YEUNG (Eds.), Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region. *Springer Singapore*, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-981-16-6498-4

Nishesh, S., Nishant, K., Jerin, J., Sonika, K., & Shivani, J. (2023). Strategies for successful acclimatization and hardening of *in vitro* regenerated plants: Challenges and innovations in micropropagation techniques. *Plant Science Today, 10*(2), 90-97. https://doi.org/10.14719/pst.2376

Norouzi, O., Hesami, M., Pepe, M., Dutta, A., & Jones, A. (2022). *In vitro* plant tissue culture as the fifth generation of bioenergy. *Scientific Reports, 12*, 5038. https://doi.org/10.1038/s41598-022-09066-3

Oliya, B., Kim, M., & Lee, S. (2022). *In vitro* propagation, lactucin quantification, and antAIBcterial activity of Indian lettuce (*Lactuca indica* L.). *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *58*(3), 361-371. https://doi.org/10.1007/s11627-021-10234-9

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [ FAOLEX], 2019. Actualización en el procedimiento para el establecimiento de requisitos fitosanitarios provisionales. https://www.fao.org/faolex/results/details/es/c/LEX-FAOC183619

Ornella, A., & De la Cruz, Y. (2019). Multiplicación *in vitro* de *Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm. (Ericaceae). *Biotecnología Vegetal, 19*(4), 265–275. https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/643

Ouyang, X., Wang, Q., Li, X., Zhang, T., & Rastogi, S. (2023). Laminar airflow ventilation systems in orthopaedic operating room do not prevent surgical site infections: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, *18*, 572. https://doi.org/10.1186/s13018-023-03992-2

Phillips, G., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *55*(3), 242–257. https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5

Pincelli, R., Tang, Q., Miller, B., & Cohen, J. (2024). Horticultural potential of chemical biology to improve adventitious rooting. *Horticulture Advances*, *2*(1), 12. https://doi.org/10.1007/s44281-024-00034-7

Rafiq, S., Rather, Z., Bhat, R., Nazki, I., AL-Harbi, M., Banday, N., Farooq, I., Samra, B., Khan, M., Ahmed, A., & Andrabi, N. (2021). Standardization of *in vitro* micropropagation procedure of Oriental Lilium Hybrid Cv. *'Ravenna.' Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(12), 7581–7587. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.064

Ramage, C., & Williams, R. (2002). Inorganic nitrogen requirements during shoot organogenesis in tobacco leaf discs. *Journal of Experimental Botany*, *53*(373), 1437–1443. https://doi.org/10.1093/jxb/53.373.1437

Rashwan, A., Osman, A., Karim, N., Mo, J., & Chen, W. (2023). Unveiling the Mechanisms of the Development of Blueberries-Based Functional Foods: An Updated and Comprehensive Review. *Food Reviews International*. *40*(7), 1913-1940. https://doi.org/10.1080/87559129.2023.2245025

Raspor, M., Motyka, V., Kaleri, A., Ninković, S., Tubić, L., Cingel, A., & Ćosić, T. (2021). Integrating the Roles for Cytokinin and Auxin in De Novo Shoot Organogenesis: From Hormone Uptake to Signaling Outputs. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8554. https://doi.org/10.3390/ijms22168554

Ríos, M., Rocha, S., Niella, F., Keller, H., & Duarte, E. (2022). Factores que afectan el enraizamiento adventicio y brotación en estacas de *Hyptis australis* (Lamiaceae). *Revista Peruana de Biología*, *29*(1), 1-8 . https://doi.org/10.15381/rpb.v29i1.20809

Rivas, M., Friero, I., Alarcón, M., & Salguero, J. (2022). Auxin-Cytokinin Balance Shapes Maize Root Architecture by Controlling Primary Root Elongation and Lateral Root Development. *Frontiers in Plant Science, 13*, 836592. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.836592

Rivas, M., Piagentini, A., & Frisón, L. (2019). Flora fúngica contaminante natural de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. O´Neal) frescos y tratados térmicamente. *FAVE Sección Ciencias Agrarias, 19*(2), 63–72. https://doi.org/10.14409/fa.v19i2.8787

Sabatino, L. (2020). Increasing sustainability of growing media constituents and stand-alone substrates in soilless culture systems. *Agronomy*, *10*(9), 1384-1387. https://doi.org/10.3390/agronomy10091384

Sameer, M., & Nabeel, A. (2016). Effect of Different Sterilization Methods on Contamination and Viability of Nodal Segments of *Cestrum nocturnum* L. *International Journal of Research Studies in Biosciences, 4*(1), 4-9. https://doi.org/10.20431/2349-0365.0401002

Sang, Y., Cheng, Z., & Zhang, X. (2018). Plant stem cells and de novo organogenesis. *New Phytologist*, *218*(4), 1334–1339. https://doi.org/10.1111/nph.15106

Santos, A., Rodríguez, R., Fernández, Á., Sayago, A., & Weiland, C. (2024). Comparative analysis of anatomical characteristics and phenolic compounds of two highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars with different rooting ability of semi-hardwood cuttings. *Scientia Horticulturae*, *324,* 112591. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112591

Schuchovski, C., & Biasi, L. (2019). *In Vitro* Establishment of 'Delite' Rabbiteye Blueberry Microshoots. *Horticulturae*, *5*(1), 24-38. https://doi.org/10.3390/horticulturae5010024

Shivani, S., Isha, S., Aparna, M., & Pratap, P. (2021). Plant Hormonal Crosstalk: A Nexus of Root Development. *Rhizobiology: Molecular Physiology of Plant Roots* .Springer International Publishing, 129-147. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-84985-6_9

Siamak, B., & Mohan, J. (2020). Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of *In Vitro* Plant Regeneration. *Plants*, *9*(6), 702-722. https://doi.org/10.3390/plants9060702

Silva, S., Costa, E., Veiga, M., Morais, R., Calhau, C., & Pintado, M. (2020). Health promoting properties of blueberries: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(2), 181–200. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1518895

Taghizadeh, M., & Dastjerdi, M. (2021). Inhibition of browning problem during the callogenesis of *Spartium junceum* L. *Ornamental Horticulture*, *27*(1), 68-77. https://doi.org/10.1590/2447-536X.V27I1.2230

Teixeira, J., Zeng, S., Godoy, G., Rivera, R., & Dobránszki, J. (2019). Bixa orellana L. (achiote) tissue culture: a review. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, *55*, 231-241 https://doi.org/10.1007/s11627-019-09969-3

Tejada, J., Meléndez, J., Vilca, N., Huaman, E., Lapiz, Y., Neri, J., Prat, M.., & Oliva, M. (2022). Optimizing factors influencing micropropagation of "Bluecrop" and "Biloxi" blueberries and evaluation of their morpho-physiological characteristics during ex vitro acclimatization. *Journal of Berry Research, 12*(3), 347-364. https://doi.org/10.3233/JBR-211565

Tesfaye, B., & Haile, B. (2024). In vivo regeneration efficiency of enset (*Ensete ventricosum* (Welw.) Cheesman) using indigenous shoot induction method developed in Ethiopia. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. *1*, 1-11. https://doi.org/10.1007/s11627-024-10411-6

Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K., Komatsu, H., Sugimoto, Y., & Kunitake, H. (2008). Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae*, *119*(1), 72–74. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.06.028

Varo, M., Martín, J., Mérida, J., & *Serratosa, M. (2021). Bioactive compounds and antioxidant activity of highbush blueberry (Vaccinium corymbosum*) grown in southern Spain. *European Food Research and Technology*, *247*, 1199-1208. https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-021-03701-5

Vinueza, D. (2023). Arándano, un mercado naciente con grandes oportunidades. *Revista Líderes.* https://www.revistalideres.ec/lideres/arandano-mercado-ecuador-oportunidades.html

Wada, S., Niedz, R., & Reed, B. (2015). Determining nitrate and ammonium requirements for optimal *in vitro* response of diverse pear species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *51*(1), 19–27. https://doi.org/10.1007/s11627-015-9662-4

Wang, Y., Zhang, X., Jiang, Z., Yang, X., Liu, X., Ou, X., Su, W., & Chen, R. (2023). Establishment and Optimization of Micropropagation System for Southern Highbush Blueberry. *Horticulturae*, *9*(8), 893-907. https://doi.org/10.3390/horticulturae9080893

Wawrosch, C., & Zotchev, S. (2021). Production of bioactive plant secondary metabolites through *in vitro* technologies—status and outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*(18), 6649-6668. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11539-w

Yang, H., Wu, Y., Zhang, C., Wu, W., Lyu, L., & Li, W. (2022). Growth and physiological characteristics of four blueberry cultivars under different high soil pH treatments. *Environmental and Experimental Botany*, *197*, 104842. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104842

Yoo, J. (2018). Review of Disinfection and Sterilization – Back to the Basics. *Infection & Chemotherapy*, *50*(2), 101-109. https://doi.org/10.3947/ic.2018.50.2.101

Zabed, H., Akter, S., Yun, J., Zhang, G., Awad, F., Qi, X., & Sahu, J. (2019). Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 105*, 105-128. https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.048

Zahid, G., Iftikhar, S., Shimira, F., Ahmad, H., & Aka, Y. (2023). An overview and recent progress of plant growth regulators (PGRs) in the mitigation of abiotic stresses in fruits: A review. *Scientia Horticulturae, 309*, 111621. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111621

Zhang, D., Ren, L., Chen, G., Zhang, J., Reed, B., & Shen, X. (2015). ROS-induced oxidative stress and apoptosis-like event directly affect the cell viability of cryopreserved embryogenic callus in Agapanthus praecox. *Plant Cell Reports, 34*(9), 1499–1513. https://doi.org/10.1007/s00299-015-1802-0

Zhao, S., Wang, H., Liu, K., Li, L., Yang, J., An, X., Li, P., Yun, L., & Zhang, Z. (2021). The role of JrPPOs in the browning of walnut explants. *BMC Plant Biology*, *21*(1), 9. https://doi.org/10.1186/s12870-020-02768-8

Zhou, Y., Li, Q., Wang, Z., & Zhang, Y. (2023). High Efficiency Regeneration System from Blueberry Leaves and Stems. *Life*, *13*(1), 242-259. https://doi.org/10.3390/life13010242

## Anexos

### Anexo 1



**Figura 1**. Eliminación de las hojas de arándano.

### Anexo 2

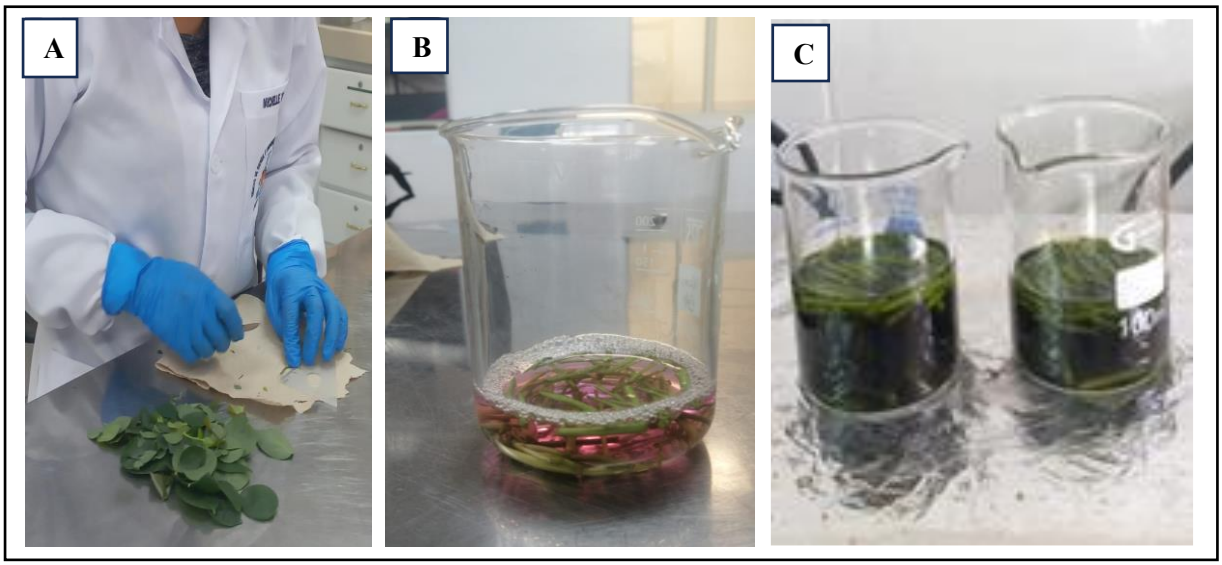



**Figura 2**. Desinfección del material vegetal fuera de la cabina de flujo laminar.

**Nota:** A) Eliminación de la parte apical de las estacas de arándano Biloxi y corte de los explantes internodales de 2 cm. B) Desinfección de los explantes con agua jabonosa. C) Desinfección de los explantes con el fungicida trimix.

**Anexo 3**

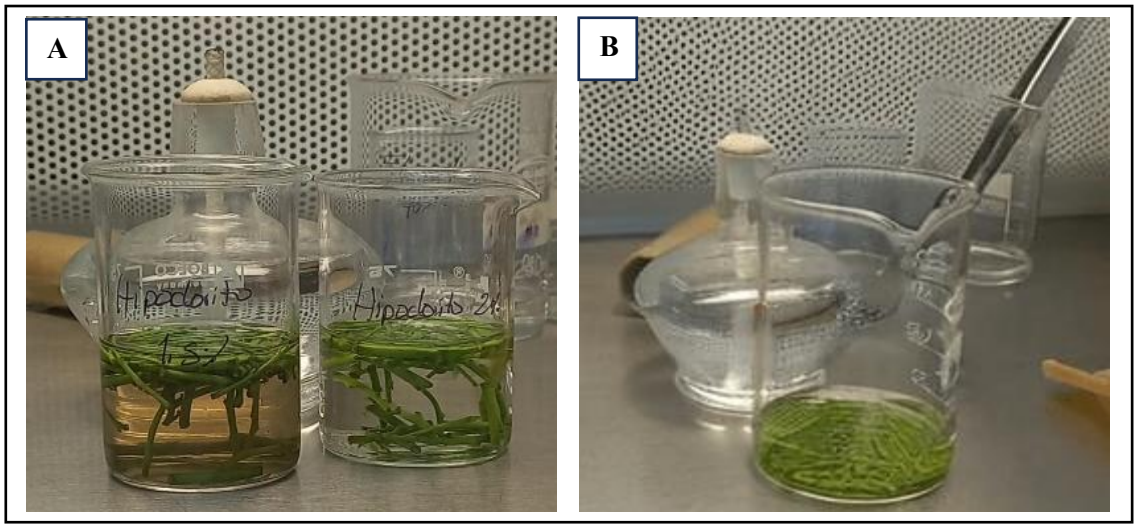



**Figura 3.** Desinfección del material vegetal dentro de la cabina de flujo laminar.

**Nota:** A) Desinfección de los explantes internodales con hipoclorito de sodio 1,5% (Tratamiento 1) y 2% (Tratamiento 2), B) Desinfección con etanol al 70% seguido con enjuagues con agua estéril.

**Anexo 4**




**Figura 4.** Proceso de micropropagación.

**Nota:** A) Plaqueo de medios de cultivo MS y WPM dentro de la cámara de flujo laminar. B) Los explantes desinfectados se insertaron en los frascos que contenían los diferentes medios de cultivo MS y WPM, preparados previamente 7 días antes de la siembra. Finalmente, los envases fueron trasladados al estante de micropropagación.

**Anexo 5**

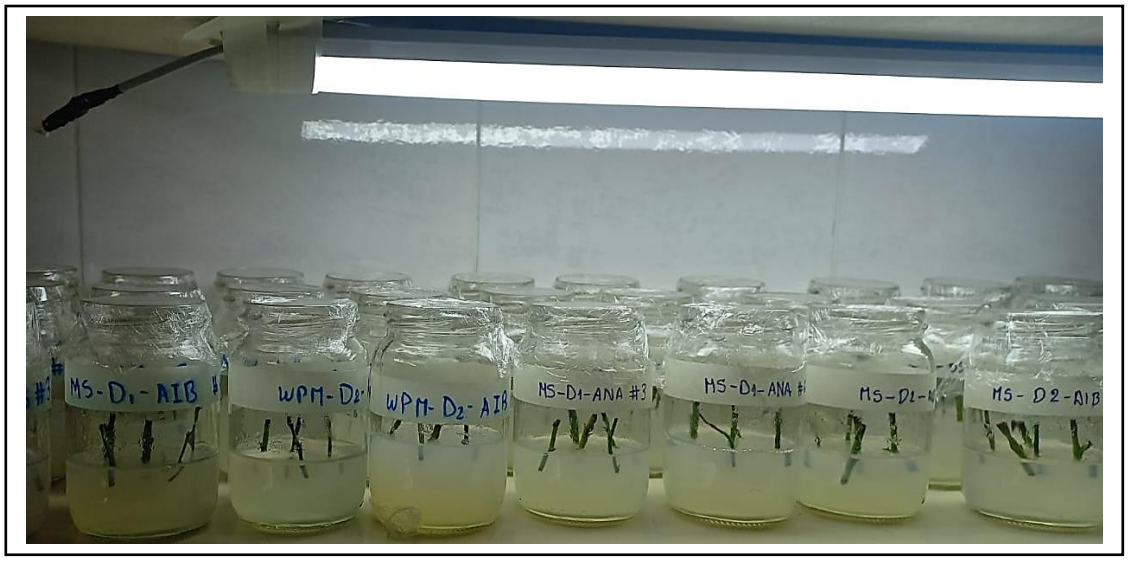



**Figura 5.** Envases de los tratamientos.

**Nota:** 1) WPM-D1-ANA, 2) WPM-D1-AIB, 3) WPM-D2-ANA, 4) WPM-D2-AIB, 5) MS-D1-ANA, 6) MS-D1-AIB, 7) MS-D2-ANA y 8) MS-D2–AIB, sellados, rotulados y ubicados en el estante de micropropagación a 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8h oscuridad.

**Anexo 6.** Análisis estadístico de desinfección combinada con contaminación.

**TABLA CRUZADA DESINFECCIÓN*CONTAMINACIÓN**

| | | | CONTAMINACIÓN | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | No presencia MO | Presencia MO | Total |
| DESINFECCIÓN | D0 | Recuento | 17 | 47 | 64 |
| | | % dentro de DESINFECCIÓN | 26,6% | 73,4% | 100,0% |
| | D1 | Recuento | 82 | 18 | 100 |
| | | % dentro de DESINFECCIÓN | 82,0% | 18,0% | 100,0% |
| | D2 | Recuento | 91 | 9 | 100 |
| | | % dentro de DESINFECCIÓN | 91,0% | 9,0% | 100,0% |
| Total | | Recuento | 190 | 74 | 264 |
| | | % dentro de DESINFECCIÓN | 72,0% | 28,0% | 100,0% |

**Anexo 7.** Tabla cruzada de desinfección combinada con oxidación

**TABLA CRUZADA DESINFECCIÓN*OXIDACIÓN**

| | | | OXIDACIÓN | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | No oxidado | Oxidado | Total |
| DESINFECCIÓN | D0 | Recuento | 40 | 0 | 40 |
| | | % dentro de DESINFECCIÓN | 62,5% | 0% | 62,5% |
| | D1 | Recuento | 85 | 15 | 100 |
| | | % dentro de DESINFECCIÓN | 85,0% | 15,0% | 100,0% |
| | D2 | Recuento | 93 | 7 | 100 |
| | | % dentro de DESINFECCIÓN | 93,0% | 7,0% | 100,0% |
| Total | | Recuento | 218 | 46 | 264 |
| | | % dentro de DESINFECCIÓN | 82,6% | 17,4% | 100,0% |

**Anexo 8.** Tabla cruzada de desinfección con viabilidad.

**TABLA CRUZADA DESINFECCIÓN*VIABILIDAD**

| | | | VIABILIDAD | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | No Viable | Viable | Total |
| DESINFECCIÓN | D0 | Recuento | 64 | 0 | 64 |
| | | % dentro de DESINFECCIÓN | 100,0% | 0,0% | 100,0% |
| | D1 | Recuento | 13 | 87 | 100 |
| | | % dentro de DESINFECCIÓN | 13,0% | 87,0% | 100,0% |
| | D2 | Recuento | 9 | 91 | 100 |
| | | % dentro de DESINFECCIÓN | 9,0% | 91,0% | 100,0% |
| Total | | Recuento | 86 | 178 | 264 |
| | | % dentro de DESINFECCIÓN | 32,6% | 67,4% | 100,0% |

**Anexo 9.** Análisis ANOVA del número de hojas a la sexta semana.

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|---|---|---|---|---|---|
| Factor | 7 | 326,7 | 46,671 | 7,99 | 0,000 |
| Error | 32 | 186,9 | 5,840 | | |
| Total | 39 | 513,6 | | | |

**MEDIAS**

| Factor | N | Media | Desv.Est. | IC de 95% |
|---|---|---|---|---|
| MS-D1-AIB_1 | 5 | 6,52 | 2,87 | (4,32; 8,72) |
| MS-D2-AIB_1 | 5 | 6,040 | 0,876 | (3,839; 8,241) |
| MS-D1-ANA_1 | 5 | 2,200 | 1,175 | (-0,001; 4,401) |
| MS-D2-ANA_1 | 5 | 4,520 | 1,921 | (2,319; 6,721) |
| WPM-D1-ANA_1 | 5 | 5,560 | 1,951 | (3,359; 7,761) |
| WPM-D2-ANA_1 | 5 | 3,680 | 1,137 | (1,479; 5,881) |
| WPM-D1-AIB_1 | 5 | 7,72 | 5,06 | (5,52; 9,92) |
| WPM-D2-AIB_1 | 5 | 12,320 | 1,375 | (10,119; 14,521) |

*Desv.Est. agrupada = 2,41651*

**Comparaciones en parejas de Tukey**

**Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%**

| Factor | N | Media | Agrupación | | |
|---|---|---|---|---|---|
| WPM-D2-AIB | 5 | 12,320 | A | | |
| WPM-D1-AIB_ | 5 | 7,72 | A | B | |
| MS-D1-AIB | 5 | 6,52 | | B | C |
| MS-D2-AIB | 5 | 6,040 | | B | C |
| WPM-D1-ANA_ | 5 | 5,560 | | B | C |
| MS-D2-ANA | 5 | 4,520 | | B | C |
| WPM-D2-ANA | 5 | 3,680 | | B | C |
| MS-D1-ANA | 5 | 2,200 | | | C |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Anexo 10**. *Análisis ANOVA de longitud de brote a la sexta semana.*

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|---|---|---|---|---|---|
| Factor | 7 | 32,232 | 4,6046 | 16,89 | 0,000 |
| Error | 32 | 8,724 | 0,2726 | | |
| Total | 39 | 40,956 | | | |

**MEDIAS**

| Factor | N | Media | Desv.Est. | IC de 95% |
|---|---|---|---|---|
| MS-D1-AIB | 5 | 1,132 | 0,632 | (0,656; 1,608) |
| MS-D2-AIB | 5 | 0,6920 | 0,1188 | (0,2164; 1,1676) |
| MS-D1-ANA | 5 | 0,4760 | 0,2002 | (0,0004; 0,9516) |
| MS-D2-ANA | 5 | 0,5080 | 0,2096 | (0,0324; 0,9836) |
| WPM-D1-ANA | 5 | 0,5880 | 0,1792 | (0,1124; 1,0636) |
| WPM-D2-ANA | 5 | 0,4280 | 0,1775 | (-0,0476; 0,9036) |
| WPM-D1-AIB | 5 | 1,332 | 1,157 | (0,856; 1,808) |
| WPM-D2-AIB | 5 | 3,288 | 0,530 | (2,812; 3,764) |

Desv.Est. agrupada = 0,522125

**Comparaciones en parejas de Tukey**

**Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%**

| Factor | N | Media | Agrupación |
|---|---|---|---|
| WPM-D2-AIB | 5 | 3,288 | A |
| WPM-D1-AIB | 5 | 1,332 | B |
| MS-D1-AIB | 5 | 1,132 | B |
| MS-D2-AIB | 5 | 0,6920 | B |
| WPM-D1-ANA | 5 | 0,5880 | B |
| MS-D2-ANA | 5 | 0,5080 | B |
| MS-D1-ANA | 5 | 0,4760 | B |
| WPM-D2-ANA | 5 | 0,4280 | B |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Anexo 11**. *Análisis ANOVA de porcentaje de enraizamiento.*

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|---|---|---|---|---|---|
| Factor | 7 | 6710 | 958,6 | 2,78 | 0,022 |
| Error | 32 | 11040 | 345,0 | | |
| Total | 39 | 17750 | | | |

**MEDIAS**

| Factor | N | Media | Desv.Est. | IC de 95% |
|---|---|---|---|---|
| MS-D1-AIB | 5 | 52,00 | 10,95 | (35,08; 68,92) |
| MS-D2-AIB | 5 | 60,00 | 14,14 | (43,08; 76,92) |
| MS-D1-ANA | 5 | 36,0 | 26,1 | (19,1; 52,9) |
| MS-D2-ANA | 5 | 48,00 | 17,89 | (31,08; 64,92) |
| WPM-D1-ANA | 5 | 56,00 | 16,73 | (39,08; 72,92) |
| WPM-D2-ANA | 5 | 60,00 | 14,14 | (43,08; 76,92) |
| WPM-D1-AIB | 5 | 64,0 | 26,1 | (47,1; 80,9) |
| WPM-D2-AIB | 5 | 84,00 | 16,73 | (67,08; 100,92) |

*Desv.Est. agrupada = 18,5742*

**Comparaciones en parejas de Tukey**

**Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%**

| Factor | N | Media | Agrupación | |
|---|---|---|---|---|
| WPM-D2-AIB | 5 | 84,00 | A | |
| WPM-D1-AIB | 5 | 64,0 | A | B |
| WPM-D2-ANA | 5 | 60,00 | A | B |
| MS-D2-AIB | 5 | 60,00 | A | B |
| WPM-D1-ANA | 5 | 56,00 | A | B |
| MS-D1-AIB | 5 | 52,00 | A | B |
| MS-D2-ANA | 5 | 48,00 | A | B |
| MS-D1-ANA | 5 | 36,0 | | B |

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*