



**Evaluación de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción del crecimiento de explantes de arándano
(*Vaccinium myrtillus*) var. Biloxi en condiciones *in vitro***

Heredia Cuichán, Darío Alexander

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario

Ing. Falconí Saá, César Eduardo Ph.D.

27 de enero del 2023



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Certificación:

Certifico que el trabajo de titulación: **Evaluación de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción del crecimiento de explantes de arándano (*Vaccinium myrtillus*) var. Biloxi en condiciones *in vitro***, fue realizado por el señor: **Heredia Cuichán, Darío Alexander**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de enero del 2023



Firmado electrónicamente por:
**CESAR EDUARDO
FALCONI SAA**

Ing. Falconi Saá César Eduardo Ph. D

C.C.0601556459

Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos

27/1/23, 15:22

Heredia Cucichán Darío Alexander_Trabajo - titulación

Informe de originalidad

NOMBRE DEL CURSO

Revisión de tesis

NOMBRE DEL ALUMNO

DARIO ALEXANDER HEREDIA CUICHAN

NOMBRE DEL ARCHIVO

Heredia Cucichán Darío Alexander_Trabajo - titulación

SE HA CREADO EL INFORME

27 ene 2023

Resumen

Fragmentos marcados	3	0,7 %
Fragmentos citados o entrecuillados	2	0,3 %

Coincidencias de la Web

espe.edu.ec	2	0,5 %
scielo.org.mx	3	0,4 %



ING. CESAR EDUARDO
FALCONI SAA

.....
Ing. Falconi Saá Cesar Eduardo Ph. D
C.C.0601556459



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría

Yo, Heredia Cuichán, Darío Alexander, con cédula de ciudadanía No. 1725265100 declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo titulación: **Evaluación de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción del crecimiento de explantes de arándano (*Vaccinium myrtillus*) var. Biloxi en condiciones *in vitro***, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 27 de enero del 2023

Heredia Cuichán, Darío Alexander

C.C.: 1725265100



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Autorización de Publicación

Yo, **Heredia Cuichán, Darío Heredia**, con cédula de ciudadanía No. 1725265100 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Evaluación de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción del crecimiento de explantes de arándano (*Vaccinium myrtillus*) var. Biloxi en condiciones *in vitro***, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios es de mi responsabilidad.

Sangolquí, 27 de enero del 2023

Heredia Cuichán, Darío Alexander

C.C.: 1725265100

DEDICATORIA

Con gran humildad y gratitud, quiero dedicar mi trabajo de tesis a Dios, por guiarme en todo momento y darme la sabiduría y el conocimiento necesarios para completar este proyecto.

También quiero dedicar mi trabajo a mis padres, Rocío Cuichán y Marcelo Heredia, por su incondicional amor y apoyo en todos los aspectos de mi vida. Su sacrificio y dedicación para brindarme una educación y una vida cómoda son la razón de mi éxito. Su amor y apoyo emocional fueron fundamentales para poder superar los obstáculos y seguir adelante con mi proyecto.

A mi hermano Christian Heredia, le quiero agradecer por su constante apoyo y por ser un gran ejemplo a seguir. Su sabiduría y consejos me ayudaron a tomar decisiones importantes en mi vida y en el proceso de realización de mi tesis.

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a un grupo de personas que han sido fundamentales en mi camino para completar mi tesis. En primer lugar, quiero agradecer al Doctor César Falconi, mi tutor de tesis, por su valiosa orientación y apoyo constante en mi proyecto. Su paciencia y dedicación para guiarme en cada paso del proceso fueron fundamentales para el éxito de mi tesis.

A Karina Calapaqui, quiero agradecerle por su incondicional amor y apoyo en los momentos difíciles. Su presencia y apoyo emocional fueron fundamentales para poder superar los obstáculos y seguir adelante con mi proyecto. Sin su ayuda, no habría sido posible completar esta tesis.

A los ingenieros Darwin Claudio y Pablo Landázuri, quiero agradecerles por compartir sus conocimientos y experiencias conmigo. Su orientación y consejos fueron de gran ayuda para poder entender mejor el campo de estudio y completar mi investigación con éxito.

A mis amigos Kevin Calvachi, Esteban Vallejo, Alexander Muñoz y Brayhant Proaño, quiero agradecerles por su compañía y apoyo en este proceso. Su amistad y apoyo en los momentos difíciles fueron fundamentales para poder mantener mi motivación y seguir adelante con mi proyecto.

Índice de contenido

Carátula	1
Certificación	2
Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
DEDICATORIA	6
AGRADECIMIENTO	7
Índice de contenido	8
Índice de tablas	12
Índice de figuras	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
CAPÍTULO I	16
INTRODUCCIÓN	16
<i>Antecedentes</i>	16
<i>Justificación</i>	17
<i>Objetivos</i>	19
Objetivo General	19
Objetivos específicos.....	19
<i>Hipótesis</i>	20
CAPÍTULO II	21
MARCO REFERENCIA	21
<i>Arándano</i>	21
<i>Morfología del arándano</i>	21

Raíces	21
Hojas.....	22
Yemas florales	22
Brotos vegetativos.....	22
<i>Variedad Biloxi</i>	23
<i>Fenología del cultivo del arándano (Vaccinium corymbosum L.)</i>	23
Etapa de desarrollo vegetativo	23
Etapa de diferenciación del botón floral.....	23
Etapa de dormancia	24
Etapa de floración	24
Etapa de desarrollo del fruto	24
<i>Micropropagación del arándano</i>	24
pH en medio de cultivo	25
Agente gelificante	25
Uso de premezclas comerciales	26
Contaminación en la micropropagación	26
<i>Contaminación bacteriana el cultivo de tejidos de plantas leñosas.</i>	27
<i>Oxidación o Ennegrecimiento</i>	28
<i>Etapas de la micropropagación</i>	29
Etapa 0: Preparación del material vegetal	29
Etapa 1: Establecimiento del cultivo.....	29
Etapa 2: Multiplicación.	29
Etapa 3: Enraizamiento y obtención de plantas completas.....	29
Etapa 4: Aclimatación y rusticación de las plantas micropropagadas	29
<i>Reguladores de Crecimiento- Hormonas (PGR):</i>	29

<i>Auxinas</i>	30
<i>Auxinas sintetizadas químicamente</i>	30
<i>Citocininas</i>	30
<i>Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)</i>	30
<i>Tipos de PGPR</i>	31
<i>Bacillus subtilis</i>	31
<i>PGPR en la micropropagación</i>	32
CAPÍTULO III	33
MATERIALES Y MÉTODOS	33
<i>Inoculación de Bacillus subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5</i>	33
<i>Obtención de material vegetal</i>	37
<i>Desinfección del área de trabajo</i>	37
<i>Desinfección del material vegetal</i>	37
<i>Diseño experimental</i>	41
<i>Variables a medir</i>	42
<i>Fase inicial in vitro</i>	42
<i>Porcentaje de oxidación</i>	42
<i>Porcentaje de contaminación</i>	43
<i>Peso fresco de los brotes</i>	43
<i>Variables y Análisis estadístico</i>	43
CAPÍTULO IV	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
<i>Resultados</i>	44
<i>Discusión</i>	51
CAPÍTULO V	54

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 54

Conclusiones 54

Recomendaciones 55

Bibliografía 56

Índice de tablas

Tabla 1 Diluciones del ácido 3-indol acético.....	35
Tabla 2 Distribución del experimento para etapa de introducción.....	41
Tabla 3 Media \pm desviación estándar de la altura (mm) en brotes de microexplantes de <i>V. myrtillus</i> en condiciones in vitro	49
Tabla 4 Prueba Tukey del peso fresco (mg) de los brotes de microexplantes de <i>V. myrtillus</i> en condiciones in vitro	49

Índice de figuras

Figura 1 Etapas de la micropropagación y los microorganismos que producen contaminación	27
Figura 2 Visión satelital del lugar de estudio	33
Figura 3 Centrifugado del sobrenadante de B.Subtilis S2-1	34
Figura 4 Muestras de los sobrenadantes de B. subtilis de la cepa S2-1 y S3-5, listos para ser medido su absorbancia.....	37
Figura 5 Enjuague de los microexplantes de arándano con agua estéril posterior a su desinfección	38
Figura 6 Siembra de los microexplantes de arándano con el medio de cultivo complementado con AIA comercial y los sobrenadantes de B subtilis S2-1 y S3-5.....	40
Figura 7 Croquis del diseño experimental	42
Figura 8 Curva de calibración del espectrofotómetro para identificar el contenido de AIA.....	44
Figura 9 Contenido de AIA en los sobrenadantes de las cepas de B. subtilis S2-1 y S3-5.....	45
Figura 10 Porcentaje de contaminación fúngica de los microexplantes de V. myrtillus en medio Murashige and Shook modificado, luego de 45 días de la introducción, en condiciones controladas de 20 OC con 16 horas de luz y 6 de oscuridad, dentro de una incubadora.....	45
Figura 11 Porcentaje de contaminación bacterina de los microexplantes de V. myrtillus. en medio Murashige and Shook modificado, luego 45 días de la introducción, en condiciones controladas de 20 OC con 16 horas de luz y 6 de oscuridad, dentro de una incubadora.....	46
Figura 12 Porcentaje de oxidación de los microexplantes de V. myrtillus. en medio Murashige and Shook modificado, luego de 45 días de la introducción, en condiciones controladas a 20 OC de temperatura con 16 horas de luz y 6 de oscuridad, dentro de una incubadora.....	47
Figura 13 Medias del número de hojas de los brotes de los microexplantes de V. myrtillus, luego de 45 días de la introducción, en condiciones controladas dentro de una incubadora	48
Figura 14 Presencia de brotes provenientes de microexplantes de V. myrtillus con. en medio Murashige and Shook modificado o por efecto del tratamiento con sobrenadantes de B. subtilis	50

RESUMEN

En este estudio se evaluó el efecto del sobrenadante de dos cepas habitantes de la rizobacteria y promotora del crecimiento vegetal (PGPR) *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 y Ctpx S3-5, desarrollado en un medio de bajo coste en la promoción del crecimiento de microexplantes de arándano *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi. Los sobrenadantes fueron aplicados en un medio de cultivo para cuarenta y ocho microexplantes distribuidos en cuatro tratamientos (T1: doce explantes sin auxinas); (T2: doce explantes con auxinas comerciales); (T3: doce explantes con auxinas provenientes del sobrenadante *B. subtilis* cepa CtpxS2-1); (T4: doce explantes con auxinas provenientes del sobrenadante *B. subtilis* cepa CtpxS3-5). Los resultados mostraron que el sobrenadante de *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 controló eficientemente la contaminación bacteriana y fúngica, así como eliminó la oxidación. Por otro lado, el sobrenadante de la cepa Ctpx S2-1 indujo el mayor porcentaje de brotes (50%) y el número de hojas (15.2). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las variables evaluadas entre los dos sobrenadantes. En cuanto al crecimiento de brotes y peso fresco de los microexplantes, el valor más alto se reportó en el tratamiento con auxinas (T1), con una media de 48.17MM y 98.42MG respectivamente a los 45 días después de la introducción de los microexplantes. Este estudio demuestra el potencial de los sobrenadantes de *B. subtilis* en el cultivo in vitro de plantas leñosas como el arándano.

Palabras clave: Arándano, microexplantes, *Bacillus subtilis*, promotor de crecimiento, sobrenadante.

ABSTRACT

In this study, the effect of supernatant from two plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) *Bacillus subtilis* strains, Ctpx S2-1 and Ctpx S3-5, developed in a low-cost medium on the growth promotion of blueberry (*Vaccinium myrtillus* var. Biloxi) micropropagation was evaluated. The supernatants were applied to a culture medium for forty-eight micropropagation explants distributed in four treatments (T1: twelve explants without auxins); (T2: twelve explants with commercial auxins); (T3: twelve explants with auxins from *B. subtilis* supernatant strain CtpxS2-1); (T4: twelve explants with auxins from *B. subtilis* supernatant strain CtpxS3-5). The results showed that the *B. subtilis* supernatant strain CtpxS3-5 effectively controlled bacterial and fungal contamination, as well as eliminated oxidation. On the other hand, the supernatant from strain Ctpx S2-1 induced the highest percentage of shoots (50%) and number of leaves (15.2). However, no significant differences were found in the variables evaluated between the two supernatants. In terms of shoot growth and fresh weight of the micropropagation explants, the highest value was reported in the auxins treatment (T1), with an average of 48.17mm and 98.42mg, respectively, 45 days after the introduction of the micropropagation explants. This study demonstrates the potential of *B. subtilis* supernatants in the in vitro cultivation of woody plants such as blueberries.

Keywords: Blueberry, microexplant, *Bacillus subtilis*, growth promoter, supernatant.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) han sido utilizadas en diferentes investigaciones por su eficiencia en el desarrollo de las plantas y en el crecimiento de raíces, especialmente, en la fase de aclimatación de plántulas *in vitro*. Leite *et al.* (2021), inocularon el consorcio Bac109 y BP323EB (PGPR) en plántulas enraizadas *in vitro*. Este hecho demostró que inoculaciones de un consorcio bacteriano puede contribuir al crecimiento de *Pouteria gardneriana* durante la etapa aclimatación, lo que conduce a una mayor productividad y calidad de las plántulas. Larraburu *et al.* (2007) mencionan que la inoculación bacteriana de *Azospirillum brasilense* indujo a un enraizamiento más temprano de brotes de fotinia. Los explantes inoculados con PGPR en combinación con pulsos de inducción de auxina pueden desempeñar un papel fundamental en la organogénesis de la raíz de las plantas micropropagadas de fotinia. En diversos estudios se ha utilizado el sobrenadante de estas rizobacterias para mejorar la respuesta de los explantes cultivados *in vitro*.

Chanway & Nelson (1991), utilizaron diferentes cepas de rizobacterias de *Pseudomonas putida* G2-8 y G11-32 promotoras del crecimiento de plantas. Dicho sobrenadante promovió el crecimiento de callos de soja en un bioensayo de cultivo de tejidos, donde se incluyeron reguladores del crecimiento como parte del medio de cultivo, pero se omitieron las vitaminas (tiamina HCl, ácido nicotínico, pyndoxina HCl y mioinositol), y la inoculación con la cepa G11 -32 aumentó significativamente la biomasa del callo.

Las PGPR se caracterizan también por la producción de fitohormonas, especialmente auxinas que promueven el enraizamiento y el crecimiento vegetal. Mirza *et al.* (2001), aislaron bacterianas fijadoras de nitrógeno del tallo de plantas de caña de azúcar cultivadas en campo. La cepa llamada SC20 produjo fitohormonas como ácido indolacético (AIA) en cultivo puro. Los aislados bacterianos se

utilizaron para inocular caña de azúcar micropropagada *in vitro* donde se observó un aumento máximo en el peso de la raíz y brote sobre el control en las plántulas inoculadas con la cepa SC20.

Se ha demostrado que la producción de fitohormonas que ayudan al desarrollo vegetal, participan en la recuperación de daños en la planta y la generación de raíces, además, Sorokan *et al.* (2021), utilizaron la cepa endofítica *B. subtilis* 26D (Cohn), misma que secreta hasta 83,6 ng / ml de AIA y hasta 150 ng / ml de citoquininas en el medio de cultivo. La presencia de *B. subtilis* 26D en los tejidos vegetales promovió una rápida recuperación de las tasas de crecimiento de los brotes, así como la masa húmeda de las raíces de las plantas de papa después del ataque de plagas, lo que se relaciona con el mantenimiento de un alto nivel de AIA, ABA y citoquininas en los tejidos.

Además Anguiano Cabello *et al.* (2019), mencionan que las cepas de *B. subtilis* deben elegirse dependiendo de la promoción de crecimiento deseado. La concentración de fitohormonas debe ser adecuada, ya que la deficiencia o exceso de ellas inhibe el crecimiento vegetal. Las fitohormonas de las rizobacter también influyen en cultivos que se encuentran en campo. Lim & Kim (2009) mencionan que las auxinas purificadas de *B. subtilis* AH18 estimularon la germinación de semillas y el crecimiento de raíces de pimiento rojo, tomate, cebollas verdes y espinacas.

Justificación

La propagación *in vitro* es una técnica biotecnológica que ayuda a la preservación y mejoramiento de especies vegetales, porque permite su propagación masiva, indistintamente de su capacidad para reproducirse de manera natural. En el mercado existe una gran variedad de hormonas sintéticas y naturales que ayudan a inducir la des diferenciación y rediferenciación celular.

Solo ciertas plantas son susceptibles al cultivo de tejidos, porque otras requieren de medios complejos y requisitos hormonales exactos, además de la adición de sustancias químicas para evitar contaminación de hongos y bacterias en el medio de cultivo. Es esencial la búsqueda de nuevas fuentes

de hormonas naturales o sintéticas para poder difundir ampliamente la técnica de cultivo de tejido, Petti (2020).

El arándano representa a nivel mundial un cultivo de importancia por su gran valor nutricional y cada año aumenta su área de producción, sin embargo, al tener un tallo leñoso tiene dificultades en la propagación *in vitro*, como menciona García & Sánchez (2016) el principal problema de las plantas leñosas en la propagación *in vitro* se presenta en la etapa de enraizamiento y en el proceso de desinfección.

Los sobrenadantes de las rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR) representan una gran alternativa en la preparación de medios para el cultivo *in vitro*, por la producción de hormonas vegetales y otros metabolitos útiles para el desarrollo de los explantes. La bacteria *Bacillus subtilis* es una PGPR que produce auxinas, citoquininas, sideróforos, ácidos orgánicos y antibióticos, Yáñez-Mendizábal & Falconí (2021) Flores Olivas *et al.* (2019).

Las citoquininas son sintetizadas por la planta, pero cuando se añade esta hormona estimula su crecimiento Arkhipova *et al.* (2005), los sideróforos quelatan el hierro y solubilizan el fósforo disponible lo que hace a los elementos más asimilables para la planta Abdel-aziz *et al.* (2013). El ácido 3-indólico acético (AIA) es una auxina, que controla procesos como el alargamiento y división celular, la formación del dominio apical, entre otras funciones, Keswani *et al.* (2020).

Otros beneficios de las PGPR involucran la generación de sustancias antifúngicas como mencionan Falco Yáñez-Mendizábal & Falconí (2018) quienes mediante cromatografía de capa fina (TLC) de extractos butanólicos de compuestos libres de células demostraron que aislamientos nativos de *B. subtilis* produjeron lipopéptidos antifúngicos, lo que indica que la antibiosis podría ser un factor importante involucrado en su capacidad de control biológico, Falconí & Yáñez-Mendizábal (2022). Además, los análisis de bioautografía por TLC confirmaron la presencia de lipopéptidos de las familias de

las fengicinas, iturinas y surfactinas y sugirieron una fuerte actividad antifúngica y antibiótica, factores que contribuye a reducir la contaminación en el proceso de micropropagación de arándano.

Debido a la gran cantidad de metabolitos que producen las PGPR también son utilizadas en el enraizamiento de plantas. Según Leite *et al.* (2021) cuando inocularon cepas de PGPR en plántulas micropropagadas de *Pouteria gardneriana*, las plántulas mostraron un buen desarrollo radicular, hecho que concuerda con estudios de Yáñez-Mendizábal & Falconí (2021) quienes encontraron usualmente, *B. subtilis* fermentado en un medio sintético, cuyos ingredientes son costosos, en este estudio las cepas nativas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 promotoras de crecimiento de raíces de *Lupinus mutabilis* y eficientes en el control de la antracnosis del chocho Falconí & Yáñez-Mendizábal (2022), fueron desarrolladas en un medio de bajo costo Yáñez-Mendizábal *et al.* (2012a). Es importante producir a la bacteria a un menor costo con proyección en el mediano plazo a su industrialización.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto de sobrenadantes de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción del crecimiento de microexplantes de arándano (*Vaccinium myrtillus*) var. Biloxi en condiciones *in vitro* .

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de las auxinas provenientes del sobrenadante de dos cepas de *B. subtilis* sobre explantes de arándano.
- Verificar el efecto antifúngico y antibiótico del sobrenadante de *B. subtilis* en el medio de cultivo y microexplantes de arándano.
- Cuantificar el porcentaje de oxidación de los microexplantes de arándano expuestos al sobrenadante de *B. subtilis* en condiciones *in vitro*.

Hipótesis

H0= Sobrenadantes de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 crecido en medio de bajo coste no tienen efecto sobre el crecimiento, resistencia a enfermedades y mortalidad de explantes de arándano (*Vaccinium myrtillus*) en condiciones *in vitro*.

H1=Sobrenadantes de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 crecido en medio de bajo coste tienen efecto sobre el crecimiento, resistencia a enfermedades y mortalidad de explantes arándano (*Vaccinium myrtillus*) en condiciones *in vitro*.

CAPÍTULO II

MARCO REFERENCIA

Arándano

El género *Vaccinium* está constituido por 450 especies aproximadamente, una gran parte de estas especies están distribuidas en las laderas montañosas de los trópicos, pero también se encuentran en climas subtropicales, templados y boreales del hemisferio norte. Países como Estados Unidos y Canadá lideran la producción del arándano con un 37% y 24% de la producción mundial, respectivamente, Vander (1988).

En el Ecuador también se ha promovido el cultivo de esta baya, con diversos proyectos como el de introducción del cultivo de arándanos Biloxi y Emerald, en enero del 2019, en el que se sembraron más de seiscientas plantas de cada variedad tanto a campo abierto y bajo invernadero. Con el objetivo de mejorar el nivel económico de los pequeños productores de la provincia de Tungurahua. Una gran importancia que tiene los arándanos son los beneficios a la salud, El productor. (2019). Almeida *et al.* (2019), mencionan que el arándano tiene importantes propiedades antioxidantes debido a que mantiene compuestos de alto contenido fenólico en su estructura. Las bayas están relacionadas con la prevención de varias enfermedades crónicas y degenerativas, como el cáncer y los trastornos cardiovasculares.

Morfología del arándano

Raíces

Los arándanos presentan dos tipos de raíz, las primeras se denominan almacenamiento grueso raíces y tienen un diámetro de hasta 11 mm, la función de este tipo de raíces es el anclaje de la planta además del almacenamiento de nutrientes. El segundo tipo de raíces son finas y tienen forma de hilo, su diámetro apenas ronda el milímetro de diámetro, estas raíces absorben el agua y nutrientes del sustrato donde se desarrolla la planta, Retamales & Hancock (2012).

Las raíces del arándano no presentan pelos radiculares y a su vez mantienen relación con una especie de micorriza endotrófica. Se sabe que el 50% de las raíces están dentro de los 30 cm de la corona y del 80-85% se encuentra dentro de los 60 cm de la misma. Las tasas de riego altas y continuas podrían aumentar la profundidad de la raíz, Retamales & Hancock (2012).

Hojas

Las hojas de los arándanos se disponen de manera alternativa en el tallo de la planta y suelen ser simples, enteras o aserradas. Las hojas de las especies High Bush y Rabbit Eye son de hoja caduca, pero existen cultivares en los que sus hojas son perennes si las temperaturas son extremadamente bajas. En cuanto a la forma de la hoja, puede ser elíptica, espatulada y ovalolanceolada, Retamales & Hancock (2012).

Yemas florales

El inicio de la diferenciación de los botones empieza en plantas el primer año después de sembrada a mediados o finales del verano. En la primavera, se aprecia el agrietamiento de los capullos en las flores, de acuerdo a la temperatura. Existen varias etapas bien diferenciadas del desarrollo de la floración, éstas son: el hinchamiento y el agrietamiento de las yemas, racimo apretado, rosa temprano, rosa tardío, rosa temprano floración, plena floración, caída de pétalos y expansión de frutos, Retamales & Hancock (2012).

Brotos vegetativos

Depende del cultivar y la temperatura, la brotación vegetativa se presenta más lento de lo que inicia la brotación floral. Mientras los brotes vegetativos se abren, las hojas del arándano se encuentran en grupos alrededor del tallo, a medida que crece la planta, estas hojas se separan por la expansión de los entrenudos, Retamales & Hancock (2012).

Los brotes crecen de manera simpodial y episódico. En el caso de los brotes individuales, en su primera etapa, crecen de manera acelerada pero luego el crecimiento se detiene por un aborto apical,

que se llama "punta negra". Los brotes presentan múltiples flujos de crecimiento de acuerdo a las condiciones ambientales en las que se desarrolle, de esta manera, el crecimiento es generado nuevamente siempre y cuando la yema axilar es liberada de la latencia, además de esto la punta negra se desprende, Retamales & Hancock (2012).

Variedad Biloxi

Es la más producida en Latinoamérica por su rusticidad, adaptación, tamaño, calidad del fruto, comportamiento en poscosecha y productividad, estas características hacen que esta variedad sea preferida por los productores. Es de producción temprana, su requerimiento anual de frío es de 400 horas. En cuanto a las características del fruto, se puede decir que es de color azul firme, en condiciones del trópico alto presenta de 14 a 18 grados Brix (°Bx), Leguízamo (2021).

Fenología del cultivo del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)

En el ciclo fenológico del arándano es importante diferenciar dos etapas principales, la primera es la del crecimiento y la segunda la del desarrollo. Al hablar de la función edafoclimática en el cultivo, fisiológicamente la planta del arándano presenta un ciclo anual. Las condiciones edafoclimáticas de Ecuador permiten que las etapas de crecimiento y desarrollo del arándano, se den en forma continua, no dependen de estaciones climáticas como lo harían en países productores subtropicales, Leguízamo (2021).

Etapas de desarrollo vegetativo

Cuando la planta se establece en el lugar definitivo para su producción es donde inicia el crecimiento de los ápices vegetativos, debido a la acumulación de carbohidratos y minerales diluidos.

Etapas de diferenciación del botón floral

Aquí se presenta la diferenciación floral (inducción), y los ápices vegetativos en se transforman en ápices reproductivos.

Etapas de dormancia

En esta etapa el crecimiento vegetativo y reproductivo se detienen.

Etapas de floración

Después de la diferenciación floral, se continúa con los procesos de polinización, fecundación y llenado del fruto.

Etapas de desarrollo del fruto

Es una etapa que se desarrolla simultáneamente con el crecimiento y desarrollo de los meristemos vegetativos, conjuntamente con las fases de maduración de las estructuras reproductivas.

Micropropagación del arándano

La propagación vegetativa (meristemos) del arándano, es la más común pues desde un enfoque comercial, se garantiza la uniformidad del cultivo y las características propias del mismo, además de conseguir una planta libre de patógenos. La micropropagación en planta de arándano se basa en técnicas de cultivo de tejido, donde se hace uso de meristemos axilares, como explantes.

Para esta técnica es necesario suministrar los nutrientes adecuados, además de mantener las condiciones ambientales adecuadas para que los tejidos a reproducir se desarrollen de manera exitosa. El medio en donde se desarrolla la planta está conformado por nutrientes, agua, fuentes de carbono (sacarosa), vitaminas, reguladores del crecimiento (auxinas, citoquininas y giberelinas) y un agente quelante (en el caso de medio sólido), Gómez & Abdelnour (2013).

Las etapas fundamentales en la micropropagación incluyen la esterilización de la superficie, reproducción y enraizamiento, también se debe hacer uso de un medio adecuado para el desarrollo de los explantes, recomiendan un medio para planta leñosa de Lloyd y McCown (1980) (WPM) o WPM modificado, este es el medio primordial para todas las especies de *Vaccinium*.

Además del medio se hace uso de fitohormonas como las citoquininas, 6-(γ,γ -dimetilalilamino)-purina (2-isopenteniladenina) (2iP) y zeatina, estas sustancias ayudan a que la proliferación se acelere. La mayoría de los explantes de *Vaccinium* deben permanecer de 20-25°C y con un fotoperíodo de 16 h de 10-75 mol/m²/s. Para la etapa de enraizamiento es necesario establecer las plantas a temperaturas frías dentro de un invernadero o en pisos cubiertos, Leguízamo (2021).

Es importante que todo el procedimiento se lleve bajo condiciones de asepsia, además los medios de cultivo deben cambiarse continuamente con el fin de reponer los nutrientes para el crecimiento regular de los tejidos sembrados, Debnath & McRae (2010).

pH en medio de cultivo

Como en todo cultivo, el pH del medio donde se desarrolla el cultivo puede influir negativa o positivamente en la absorción de nutrientes por parte del tejido en cultivo, solubilidad de sales y eficacia gelificante del agar. El pH del medio para cultivo in vitro de arándano debe mantenerse en 5.8 para el amortiguamiento de las sales presentes en el medio, si el pH es mayor al valor estimado podría alterar la dureza del medio, por otro lado, si el pH es inferior a 5.0 evita una correcta gelificación del agar debido a un proceso de hidrólisis al momento de autoclavar. Hay que tener en cuenta que el pH del medio de cultivo tiende a decaer de 0.3 a 0.5 unidades después del proceso de autoclavado. También durante el período de cultivo a razón de la oxidación y absorción de iones como NH₄⁺ y NO₃⁻ y por la secreción de sustancias del tejido en crecimiento, Bhojwani & Dantu (2013).

Agente gelificante

Para evitar la muerte de los tejidos en condiciones anaeróbicas, es necesaria la solidificación del medio a través de un agente gelificante, este elemento posee propiedades que benefician al medio, algunas de estas son: la capacidad de soportar la esterilización por autoclave, mantener su fluidez cuando se encuentra a una temperatura elevada y de esta manera facilitar el proceso de dispensado, además la naturaleza semisólida del medio hace manejable la siembra del material vegetal en su

superficie. Algunos ejemplos de agentes gelificantes comúnmente utilizados en este tipos de cultivo son: agar, agarosa y gellan goma de mascar (phytagel, Gelrite), Bhojwani & Dantu (2013).

Uso de premezclas comerciales

Las bases de los medios de cultivo se preparan con formulaciones que comercialmente son expendidos a manera de una pre mezcla en polvo. Para su uso el polvo se disuelve en el 10 % del total de agua destilada a usar, para después complementar con sacarosa, agar y otros suplementos deseados y finalmente el medio se completa con el restante de agua destilada. Existen medios en polvo específicos para la especie de plantas. Estas formulaciones ahorran tiempo y almacenamiento de productos químicos que se mezclan para obtener medios similares, Bhojwani & Dantu (2013).

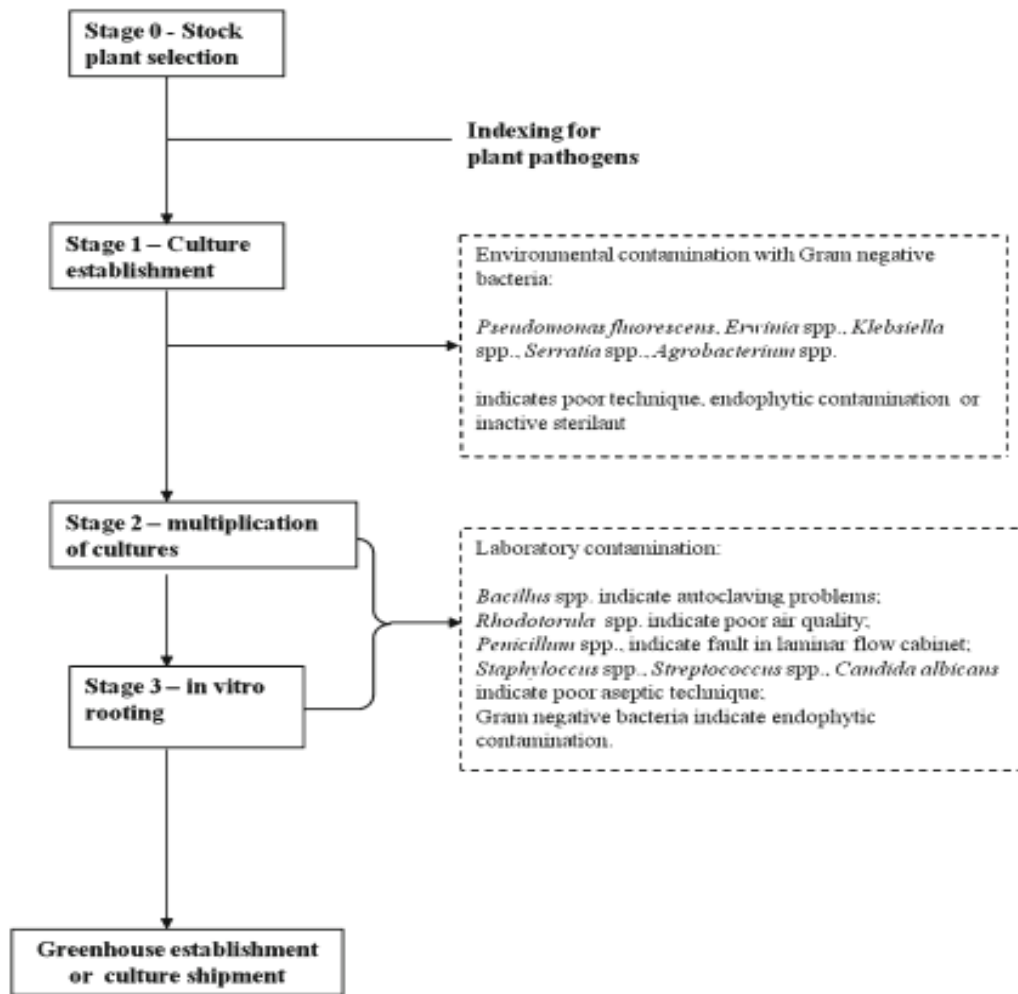
Contaminación en la micropropagación

Uno de los objetivos de este tipo de propagación es establecer cultivos libres de contaminación biológica durante todo el proceso *in vitro*, esto quiere decir, manipulación, crecimiento y almacenamiento. La asepsia es fundamental debido a que los contaminantes de cualquier tipo, alteran el adecuado desarrollo de los tejidos porque existe la secreción de metabolitos y proteínas que pueden dañar los explantes sembrados y también del medio, cambiando su pH.

El motivo del alto riesgo de contaminación en estos cultivos se debe a la alta carga de nutrientes en el medio donde se desarrolla el material vegetal sembrado. Generalmente se enfatiza la eliminación de fitopatógenos y otros contaminantes como bacterias ambientales y micro artrópodos, dentro de un laboratorio para evitar descartes, Cassells (2012).

Figura 1

Etapas de la micropropagación y los microorganismos que producen contaminación



Nota. La presencia de estos microorganismos indica falta de aséptica o falla técnica de equipo en las etapas respectivas. Autor Cassells (2012).

Contaminación bacteriana el cultivo de tejidos de plantas leñosas.

En la micropropagación de las plantas leñosas se ha encontrado muchos problemas de contaminación. Se ha encontrado tratamientos efectivos haciendo uso de antibióticos, a pesar de esto se considera que esta es una solución parcial ya que si bien estas sustancias inhiben inicialmente el crecimiento bacteriano no se ha reportado una solución permanente en todo el proceso, Viss *et al.* (1991)

Se puede propagar material vegetal certificado y libre de microorganismos patógenos, pero esta estrategia necesita de una técnica infalible de detección de material limpio lo que aumentaría los costos y la técnica dejaría de ser rentable.

Un error común es la identificación de contaminación bacteriana por medios visuales hay diversos tipos de bacterias y sus poblaciones no siempre crecerán lo suficiente para ser observadas a simple vista, sin contar que algunas veces el crecimiento bacteriano tiene similitudes con algunos exudados de explantes, Viss *et al.* (1991).

Oxidación o Ennegrecimiento

Es un problema común en la micropropagación de plantas leñosas y se observa manchas oscuras en el tejido vegetal debido a la oxidación celular por radicales libres, esto ocasiona daños como la alteración del crecimiento que puede inducir a una necrosis hasta la muerte de la planta sembrada.

La oxidación en los cultivos *in vitro* se produce por el efecto invasivo causado por los agentes químicos usados en la etapa de desinfección explante, el corte del tejido, cambios en el pH, composición del medio de cultivo, también influyen factores como volumen y la calidad del frasco en el que el tejido será cultivado, Sharry (2020).

Se han planteado varias soluciones para contrarrestar la oxidación en la micro propagación, entre ellos.

- Hacer uso de explantes en estado juvenil o en crecimiento activo.
- Disminuir la intensidad de la luz de cultivo.
- Disminuir la temperatura de cultivo.
- Agregar antioxidantes al medio de cultivo.
- Disminuir el pH del medio de cultivo.

Etapas de la micropropagación

Etapa 0: Preparación del material vegetal

En esta etapa se selecciona y separa los explantes de la planta madre.

Etapa 1: Establecimiento del cultivo.

Se inicia el proceso de cultivo *in vitro* mediante la introducción de los explantes.

Etapa 2: Multiplicación.

En esta etapa se debe mantener el explante a través del uso de reguladores de crecimiento y en lo posible aumentar la cantidad de brotes que se necesitarán en los siguientes ciclos de multiplicación y de esta manera destinar parte de ellos a la siguiente etapa. Es importante evitar la formación de callos porque de esta manera se logra atenuar el riesgo de variación soma clonal, Sharry *et al.* (2013).

Etapa 3: Enraizamiento y obtención de plantas completas

Esta etapa es crucial para la planta, aunque se considera que la producción de raíces es más complicada en especies leñosas porque tienen baja capacidad rizogénica. Por lo que en este tipo de cultivo *in vitro* es necesario usar reguladores de crecimiento como las auxinas para promover el crecimiento de las raíces. Además de estos promotores, el sustrato adecuado para el desarrollo de las raíces es otro pilar para lograr el éxito en esta fase Sharry *et al.* (2013).

Etapa 4: Aclimatación y rusticación de las plantas micropropagadas

El objetivo de esta fase es evitar o disminuir porcentajes elevados de pérdidas al momento de colocar las plántulas a un invernadero o al campo directo, Sharry *et al.* (2013).

Reguladores de Crecimiento- Hormonas (PGR):

Los reguladores de crecimiento integrados al medio definen la función del medio durante la etapa en la que se encuentre el explante.

Auxinas

Las auxinas son fitohormonas que estimulan crecimiento celular y su alargamiento además de la división celular en cultivos de tejidos. Pueden combinarse con otras hormonas, en etapa de multiplicación y enraizamiento usualmente se las integran junto a las citoquininas aportando viabilidad al explante.

El ácido indolacético (AIA) es la única auxina que se encuentra de manera natural en las áreas de crecimiento de las plantas, sin embargo, no dura mucho tiempo en los tejidos porque es un compuesto hidrolizado pro enzimas oxidasas Sharry *et al.* (2013).

Auxinas sintetizadas químicamente

Estas sustancias derivan del ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4 diclorofenoxiacético y ácido indolbutírico (AIB). Participan activamente en la morfogénesis, embriogénesis somática, enraizamiento y en el crecimiento de ápices. La dosificación de auxinas depende de los niveles de la fitohormona presentes en la planta naturalmente, Sharry *et al.* (2013).

Citocininas

Promueven la división celular, en altas concentraciones inducen la formación de brotes y estimulan la multiplicación de tallos y yemas laterales por la reducción de la dominancia apical. Se sabe que estas hormonas retrasan el envejecimiento celular y ayudan a las auxinas a transportarse, Sharry *et al.* (2013).

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

Las PGPR son microorganismos pertenecientes a la rizosfera, se ha demostrado que son capaces de estimular el crecimiento de los cultivos y actuar como un biocontrolador. Las características de las PGPR las hacen muy adaptables a cualquier entorno en especial su rápida tasa de crecimiento, versatilidad y bioquímica para sintetizar diversos compuestos naturales, Bhattacharyya & Jha (2012).

En general, la relación que existe entre las plantas y las PGPR es simbiótica, aunque existen casos en los que estos microorganismos no muestran ningún efecto visible sobre el crecimiento y fisiología general de la huésped e incluso interacciones negativas por la producción de sustancias fitotóxicas como el cianuro de hidrógeno o el etileno, pero este tipo de relación es poco común Bhattacharyya & Jha (2012).

Tipos de PGPR

Se clasifican de acuerdo al nivel de relación con las células de la raíz de la planta, así:

PGPR extracelular (ePGPR): habitan en la rizosfera, en el rizoplano y directamente en la corteza de la raíz algunas especies de bacterias ePGPR son: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacilo*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas* y *Serratia*

PGPR intracelular (iPGPR): están en el interior de las zonas nodulares especializadas de las células de la raíz, por lo que se reconocen por ser fijadoras de nitrógeno. Las especies de *Frankia*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* son un ejemplo de este tipo de rizobacterias, Bhattacharyya & Jha (2012).

Bacillus subtilis

B. subtilis es una PGPR caracterizada por producir metabolitos como auxinas, sideróforos, ácidos orgánicos y antibióticos. Se ha determinado que todas las cepas de *B. subtilis* tienen un efecto promotor de crecimiento, Falconí & Yáñez-Mendizábal (2022); Yáñez-Mendizábal & Falconí (2021), sin embargo, la producción de metabolitos puede darse en distintas concentraciones, Cabello *et al.* (2019).

B. subtilis tiene propiedades antifúngicas y antibióticas, Yáñez-Mendizábal & Falconí (2018a), identificaron la presencia de lipopéptidos antifúngicos, lo que determina su capacidad de control biológico. Además, los análisis de bioautografía por TLC encontraron lipopéptidos de fengicina, iturina y surfactina y la fuerte actividad antifúngica se debe a los lipopéptidos de fengicina.

También *B.subtilis* tiene la capacidad de producir ácido indolacético y solubilizar el fosfato, Cochard *et al.* (2022) mencionaron que *B. subtilis* B18 produjeron (4,08 mg*L⁻¹) de AIA y , B25 (4,34 mg*L⁻¹), mostraron ser buenos productores de AIA.

PGPR en la micropropagación

La micropropagación clonal de cultivos de plantas in vitro es ampliamente utilizada para producir plantas libres de enfermedades. Esta técnica es realizada en condiciones de cultivo asépticas, y al incluir las PGPR en el proceso se contribuye a la supervivencia de microplantas después de su transferencia al suelo de trasplante en el que la planta se encontrará con diversos microorganismos propios de las rizosferas por lo tanto al establecer la relación planta-bacteria el crecimiento de las plantas y potencial de adaptación serán mejores, Bashan *et al.* (2014)

Se ha demostrado la promoción del crecimiento en las plantas que han sido inoculadas con bacterias en condiciones in vitro. De esta manera se realiza la selección de cepas bacterianas efectivas para la promoción de la organogénesis y la resistencia de los cultivos a estrés de cualquier tipo Kargapolova *et al.* (2020). Se ha probado compuestos volátiles exudados por PGPR, para mejorar la organogénesis de callos en *Nicotiana Tabacum*. Pace *et al.* (2020).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y Materiales del Experimental

La investigación se desarrolló en dos fases: una en laboratorio y otra en el invernadero de Fitopatología y Control Biológico de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, ubicados en la Hacienda “El Prado”, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

La Hacienda “El Prado” se encuentra ubicada dentro del barrio San Fernando, en las coordenadas UTM Latitud: 0°, 23', 20" S y Longitud: 78°, 24', 44" O a una altitud de 2748 m.s.n.m.

Figura 2

Visión satelital del lugar de estudio



Nota. A) Invernadero de Fitopatología, B) Laboratorio de Fitopatología.

Autor Google Map (20022)

Inoculación de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5

Para la inoculación se utilizaron suspensiones de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 de 72 horas de crecimiento en medio de bajo coste, para la producción de sobrenadante Yáñez-Mendizábal *et al.* (2012a).

Medio de bajo coste

Las cepas de *B. subtilis* utilizadas en esta investigación fueron desarrolladas en un medio de bajo costo, conformado por harina de soya integral $40\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, melaza $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de agua y otros minerales, e inoculada con $100\ \mu\text{l}$ de suspensión bacteriana de *B. subtilis* para una concentración de 2×10^9 UFC/ml. Se hizo uso de $50\ \text{ml}$ del medio. Primero, la solución fue incubada a $30\ ^\circ\text{C}$, bajo agitación orbital de $150\ \text{RPM}$ durante una hora Yáñez-Mendizábal *et al.* (2012). Este fermentado fue posteriormente centrifugado a $6000\ \text{rpm}$ durante $15\ \text{min}$ (Figura 3), para extraer el sobrenadante de las partículas sólidas del medio, se filtró $20\ \text{ml}$ de este sobrenadante con ayuda de dos filtros de jeringa de $22\ \mu\text{m}$ de porosidad, para obtener el sobrenadante libre de células de *B. subtilis* de ambas cepas. Finalmente, la cantidad de auxinas en el sobrenadante se determinó mediante espectrofotometría.

Figura 3

Centrifugado del sobrenadante de B.Subtilis S2-1



Nota. Proceso de extracción de sobrenadante libre de células, para los tratamientos en el cultivo de tejidos de arándano. Autoría propia.

Cálculo de las auxinas del sobrenadante de *B. subtilis* mediante espectrometría

Se preparó el reactivo de Salkowski con 15 mL de H₂SO₄, 25 mL de agua destilada, 0,75 ml de FeCl₃ · 6H₂O (0,5 M).

Para la calibración se preparó una solución de trabajo de ácido 3-indol acético (AIA) a una concentración de 1000 ppm en etanol y medio de bajo coste (10 mg AIA en 5ml de etanol y 5ml de medio de bajo coste) (Tabla 1).

Tabla 1

Diluciones del ácido 3-indol acético

Medio de bajo coste (μ L)	Solución de trabajo (μ L)	Concentración (ppm)
1000	0	0
995	5	5
990	10	10
985	15	15
980	20	20
975	25	25
970	30	30
965	35	35

Nota. Las diluciones de AIA utilizadas para la calibración de la curva, se añadieron 2ml de reactivo de Salkowski a cada tubo de las diluciones e incubaron durante 30 min. Se tomó 1ml de cada tubo de la dilución con reactivo de Salkowski en las celdas de vidrio y se leyó a 530 nm. Autoría propia.

La concentración de AIA en cepas de *B. subtilis* se evaluó en tubos de ensayo: 1ml de sobrenadante libre de células se mezcló con 2ml de reactivo de Salkowski, se incubó durante 30 min.

Se tomó 1ml para colocar en las celdas de vidrio y se leyó a 530 nm (Figura 4). Después, las concentraciones de auxina en los sobrenadantes se calcularon utilizando el calibrador ecuación de la curva de acción con el R2 más alto (Cabello *et al.*, 2017).

Ajuste de la concentración de auxinas

Los resultados arrojados por el espectrofotómetro de la cantidad de auxinas del sobrenadante fueron de 2.46 ppm y 3.21 ppm, para el sobrenadante de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 respectivamente, para llegar a la concentración requerida de auxinas en las etapas del protocolo de micropropagación de arándano se utilizó la fórmula:

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$2.46 \text{ ppm} * V1 = 0.5 \text{ ppm} * 1000 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{0.5 \text{ ppm} * 1000 \text{ ml}}{2.46 \text{ ppm}}$$

$V1 = 20.3 \text{ ml}$ de sobrenadante de *B. subtilis* CtpxS2-1

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$3.21 \text{ ppm} * V1 = 0.5 \text{ ppm} * 1000 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{0.5 \text{ ppm} * 1000 \text{ ml}}{3.21 \text{ ppm}}$$

$V1 = 15.6 \text{ ml}$ de sobrenadante de *B. subtilis* CtpxS3-5

Figura 4

Muestras de los sobrenadantes de *B. subtilis* de la cepa S2-1 y S3-5, listos para ser medido su absorbancia.



Nota. Muestra de los sobrenadantes con reactivo de Salkowski.
Autoría propia.

Obtención de material vegetal

Se seleccionaron tallos jóvenes de aproximadamente 12 cm de longitud de las plantas madre de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedad Biloxi cultivadas en el invernadero de vidrio del área de Fitopatología.

Desinfección del área de trabajo

Un día antes del ensayo, el lugar donde se encontraba la cámara de flujo laminar fue limpiado y desinfectando, posteriormente se desinfectó con sablón las sillas, ventanas y cámara de flujo. Finalmente se fumigó con amonio cuaternario en concentraciones de 5 ml por litro de agua, todo el lugar incluido el mandil y gorro del cabello.

Media hora antes de utilizar el lugar se encendió la luz UV de la cámara de flujo.

Desinfección del material vegetal

Después de la defoliación, los tallos se lavaron con una solución de agua esterilizada y jabón líquido 2% durante 10 min y posteriormente se redujeron a aproximadamente 6 cm de largo (Figura 5). Los tallos cortados se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (1,2% NaOCl) y 4 gotas de

Tween 80%, con agitación constante durante 20 min, se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces en condiciones asépticas (Figura 5). Finalmente, los tallos se sumergieron en etanol 75% durante 10 segundos y se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. Los tallos se volvieron a cortar; (aproximadamente 3 cm) para el inicio del cultivo *in vitro*.

Figura 5

Enjuague de los microexplantes de arándano con agua estéril posterior a su desinfección.



Nota. EL enjuague se realizó tres veces después de cada desinfección dentro de la cámara de flujo laminar. Autoría propia.

Ensayos para el control de contaminación

Se mezcló en 4 botellas de un litro el medio Murashige skoog y WPM (MW) en proporción 1:1, adicional se colocó $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ sacarosa y $6\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar a cada tratamiento. El pH de todos los medios se ajustó a pH 5,8 con $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de HCl o solución de NaOH y posteriormente se llevó a la autoclave. Con filtro de 2μ se colocó un tratamiento por cada botella:

T0: solo medio

T1: $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Benomil+ $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Estreptomicina,

T2: 15 ml de sobrenadante de *B. subtilis* CtpxS2-1

T3: 15 ml de sobrenadante *B. subtilis* CtpxS3-5

Los medios se dispensaron en 12 tubos de ensayo esterilizados de 25ml con tapa por tratamiento, se dispuso de 10ml de medio en cada y posteriormente se procedió a sembrar con el material vegetal y el área de trabajo desinfectados, se realizó la observación a los 30 días.

Ensayos para el control de la oxidación

Se mezcló en 4 botellas de litro Murashige skoog y WPM (MW) en proporción 1:1, adicional se colocó 30g *L⁻¹ sacarosa y 6 g*L⁻¹ agar a cada tratamiento. El pH de todos los medios se ajustó a pH 5,8 con 1 mol*L⁻¹ de HCl o solución de NaOH y posteriormente se llevó a la autoclave. Con filtro de 2μ se colocó un tratamiento por cada botella:

T0: solo medio

T1: 500 mg*L⁻¹ de carbón activado,

T2: 15 ml de sobrenadante de *B. subtilis* CtpxS2-1

T3: 15 ml de sobrenadante *B. subtilis* CtpxS3-5

Los medios se dispensaron en 12 frascos esterilizados de 100 ml con tapa por tratamiento, se dispuso de 10ml de medio en cada y posteriormente se procedió a sembrar con el material vegetal y el área de trabajo desinfectados; la observación se realizó a los 30 días.

Preparación de medio para etapa inicial

Se mezclaron los medios Murashige skoog y WPM (MW) en proporción 1:1 y se complementó con diferentes fuentes de auxinas:

T0: sin ácido 3-indol acético

T1: 0,5 ppm de ácido 3-indol acético (AIA) comercial,

T2: 20.3 ml de sobrenadante de *B. subtilis* CtpxS2-1

T3: 15.6 ml de sobrenadante *B. subtilis* CtpxS3-5

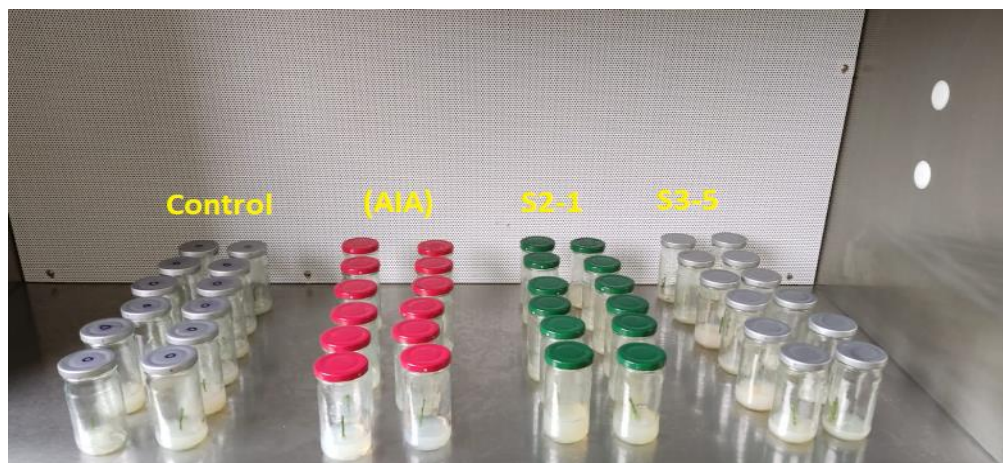
Adicionalmente, se añadió $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sacarosa y $6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar por cada tratamiento. El pH de todos los medios se ajustó a pH 5,8 con $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCl o solución de NaOH. Los medios se dispensaron en 12 tubos de ensayo de 25ml con tapa por tratamiento, se dispensó 10 ml de medio en cada tubo y posteriormente se llevó a la autoclave (Fan *et al.*, 2017).

Siembra de microexplantos en la etapa inicial

Los explantes previamente desinfectados, se ubicaron en el área de trabajo (cámara de flujo laminar). Para la siembra, se colaron los microexplantos en una superficie estéril (papel filtro esterilizado) y con ayuda de pinzas de metal estériles, se procedió a introducirlos en los tubos de ensayo o frascos con el medio estéril, cerca de un mechero de alcohol, finalmente se cubrió con parafim la tapa del tubo de ensayo o frasco, para reducir el riesgo de contaminación (Figura 6) y se llevó a la incubadora a una temperatura de 21°C , adicionalmente se proporcionó de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 30 días.

Figura 6

Siembra de los microexplantos de arándano con el medio de cultivo complementado con AIA comercial y los sobrenadantes de B subtilis S2-1 y S3-5.



Nota. Siembra de los microexplantos en el medio de cultivo en condiciones asépticas.
Autoría propia

Diseño experimental

Se evaluó la respuesta de 48 explantes de arándano *V. myrtillus var. Biloxi* por efecto de sobrenadantes de dos cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en condiciones *in vitro*. Se establecieron cuatro tratamientos (T1: doce explantes de *V. myrtillus var. Biloxi* sin auxinas); (T2: doce explantes de *V. myrtillus var. Biloxi* con auxinas comerciales); (T3: doce explantes de *Vaccinium myrtillus var. Biloxi* con auxinas provenientes del sobrenadante *B. subtilis* cepa CtpxS2-1); (T4: doce explantes de *V. myrtillus var. Biloxi* con auxinas provenientes del sobrenadante *B. subtilis* cepa CtpxS3-5).

Se estableció un DCA con 3 tratamientos y un testigo, se emplearon 12 unidades experimentales con tres repeticiones y cuatro explantes (muestras) como unidad muestral (Figura 7).

Tabla 2

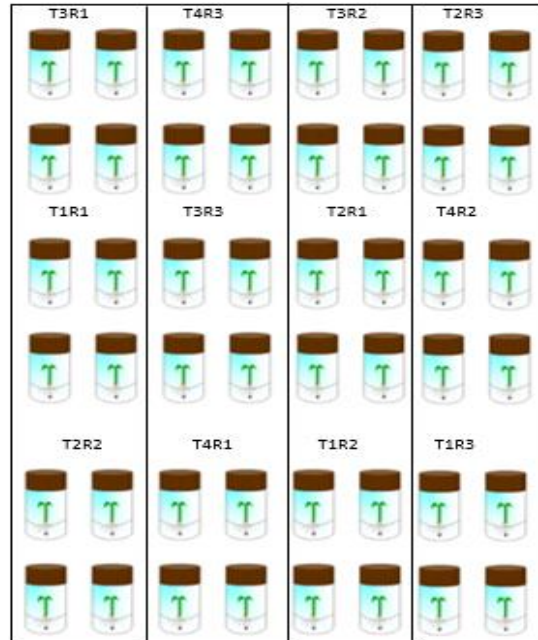
Distribución del experimento para etapa de introducción

Tratamientos	
T1	12 explantes, sin auxinas.
T2	12 explantes, con 0,57μ M de auxinas comerciales.
T3	12 explantes, con 0,57μM de auxinas provenientes del sobrenadante CtpxS2-1
T4	12 explantes, con 0,57μM de auxinas provenientes del sobrenadante de CtpxS3-5

Nota. Distribución del experimento con cada uno de los tratamientos con auxinas y sobrenadantes. Autoría propia.

Figura 7

Croquis del diseño experimental.



Nota. Croquis del experimento con distribución DCA de los tratamientos. Autoría propia.

Variables a medir

Fase inicial in vitro

Cada 15 días después del inicio del cultivo in vitro se evaluó la longitud en (mm) de los brotes axilares hasta los 45 días, además se contó el número de hojas y el porcentaje de explantes con brotes a los 45 días de haber finalizado la etapa de introducción.

Porcentaje de oxidación

El porcentaje de oxidación se evaluó después de los 45 días después de haber iniciado la fase de introducción de los microexplantes .

$$\% \text{Oxidación} = \frac{\text{Total de explante} - \text{explantes no oxidados}}{\text{Total de explantes}} \times 100$$

Porcentaje de contaminación

El porcentaje de contaminación (fúngica y bacteriana) se evaluó a los 45 días después de haber iniciado la fase de introducción de los microexplantes.

$$\% \text{Contaminación} = \frac{\text{Total de explante} - \text{explantes no contaminados}}{\text{Total de explantes}} \times 100$$

Peso fresco de los brotes

Se tomó a los 45 días de haber concluido la fase de introducción, con la ayuda de una balanza de precisión.

Variables y Análisis estadístico

Las variables altura de explantes, número de hojas de los explantes, longitud de raíces, porcentaje de contaminación, contenido de clorofila, supervivencia de plántulas, peso fresco de raíz y tallos se analizaron mediante estadística descriptiva (media, desviación estándar y coeficiente de variación). Para determinar el efecto de sobrenadantes de las dos cepas de *Bacillus subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5 sobre las variables mencionadas se realizó un análisis de varianza (ANAVA).

Se empleó el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijk} = u + T_i + M_{ij} / T_i + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variables de respuesta

U = media general

T_i = efecto del i -ésimo hormona de crecimiento vegetal

M_{ij} = muestras (4 por repetición)

E_{ij} = Error experimental

Todos los datos fueron procesados usando el software estadístico INFOSTAT con un nivel de significancia del 5%.

CAPÍTULO IV

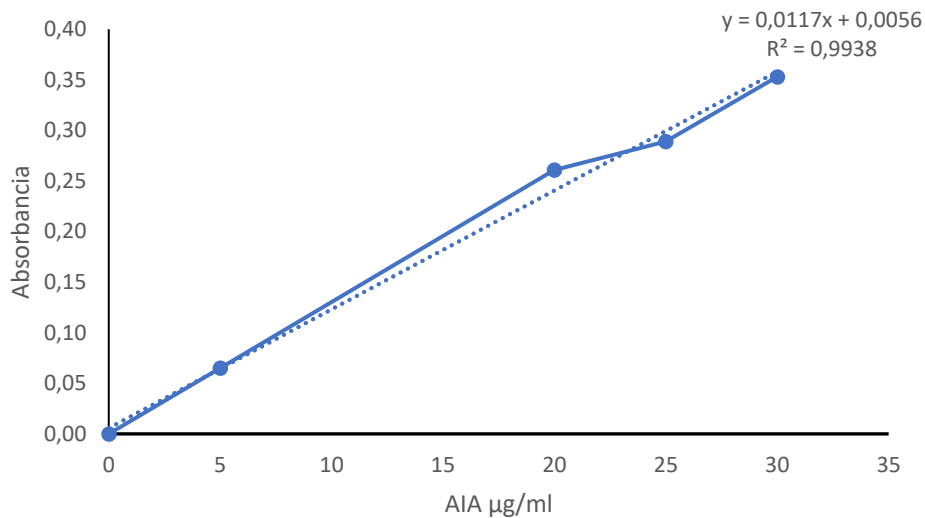
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Se puede observar en la (Figura 8) la curva de calibración de las auxinas calculadas por el espectrofotómetro, también en la (Figura 9) con ayuda del espectrofotómetro y la curva de calibración, se identificó que las muestras de los sobrenadantes de *B. subtilis* S2-1 y S3-5 contienen (2.46 y 3.21 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de AIA), respectivamente. Esto sugiere que se pueden utilizar los sobrenadantes de *B. subtilis* S2-1 y S3-5 como una fuente alternativa de hormonas, puesto que las concentraciones utilizadas para la micropropagación del arándano son iguales o inferiores a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de AIA.

Figura 8

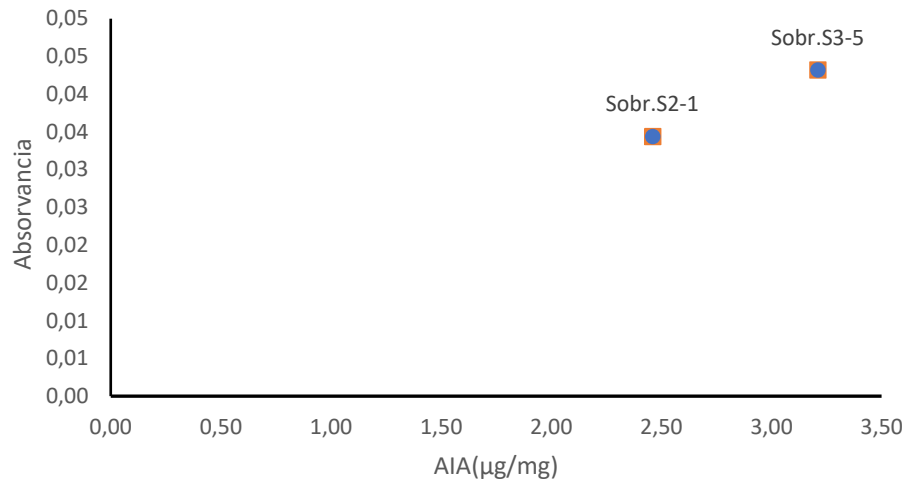
Curva de calibración del espectrofotómetro para identificar el contenido de AIA



Nota. La curva de calibración se va utilizar para conocer el contenido de AIA de los sobrenadantes. Autoría propia.

Figura 9

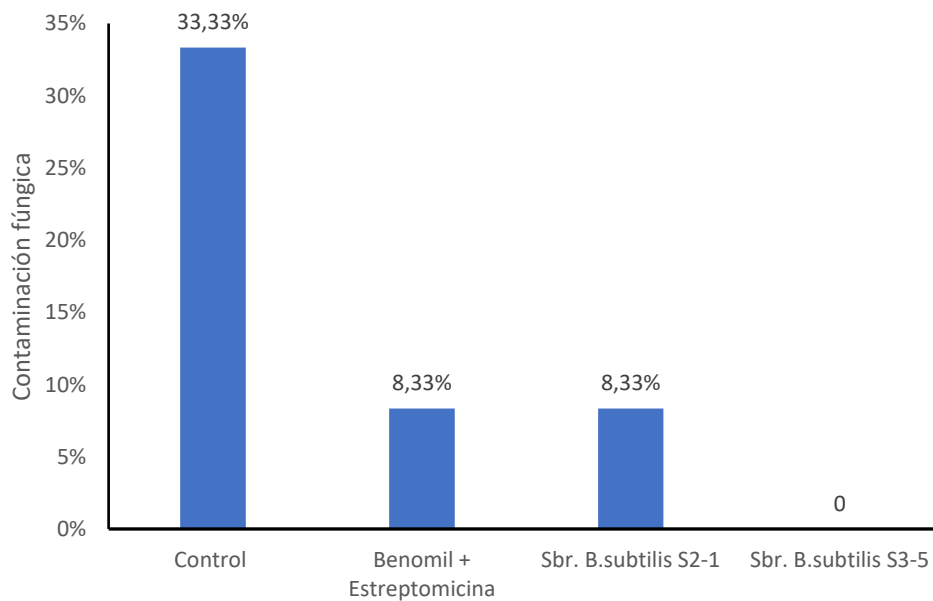
Contenido de AIA en los sobrenadantes de las cepas de B. subtilis S2-1 y S3-5



Nota. Autoría propia.

Figura 10

Porcentaje de contaminación fúngica de los microexplantes de V. myrtilus en medio Murashige and Shook modificado, luego de 45 días de la introducción, en condiciones controladas de 20 °C con 16 horas de luz y 6 de oscuridad, dentro de una incubadora.

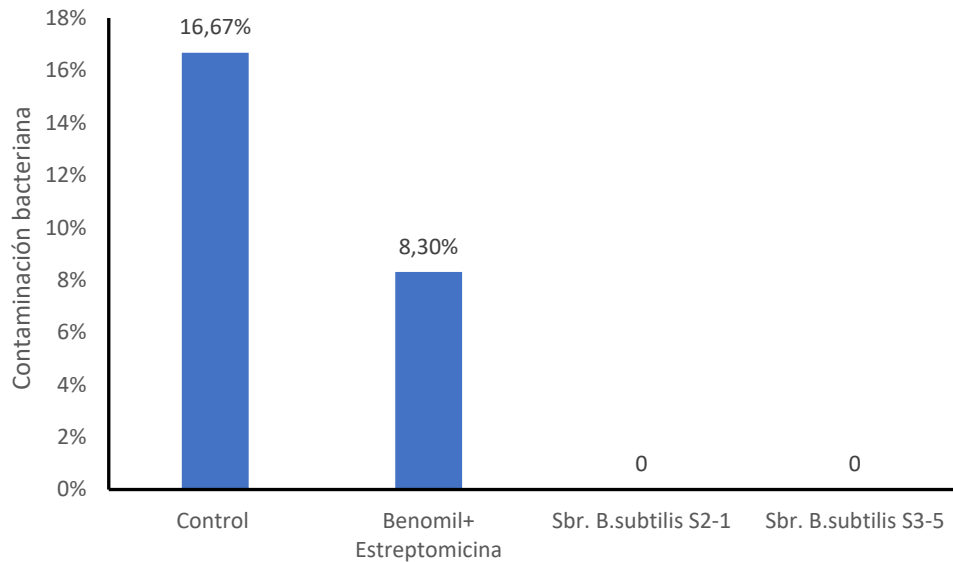


Nota. Autoría propia.

En la (Figura 10) se puede observar que la menor contaminación fúngica se obtuvo con el sobrenadante de la cepa *B. subtilis* S3-5, seguido del sobrenadante de *B. subtilis* S2-1 y el tratamiento con Benomil + Estreptomicina con una contaminación del 8.33% y finalmente el control que tuvo una contaminación fúngica de 33.33%.

Figura 11

Porcentaje de contaminación bacteriana de los microexplantos de V. myrtillus. en medio Murashige and Shook modificado, luego 45 días de la introducción, en condiciones controladas de 20 OC con 16 horas de luz y 6 de oscuridad, dentro de una incubadora.

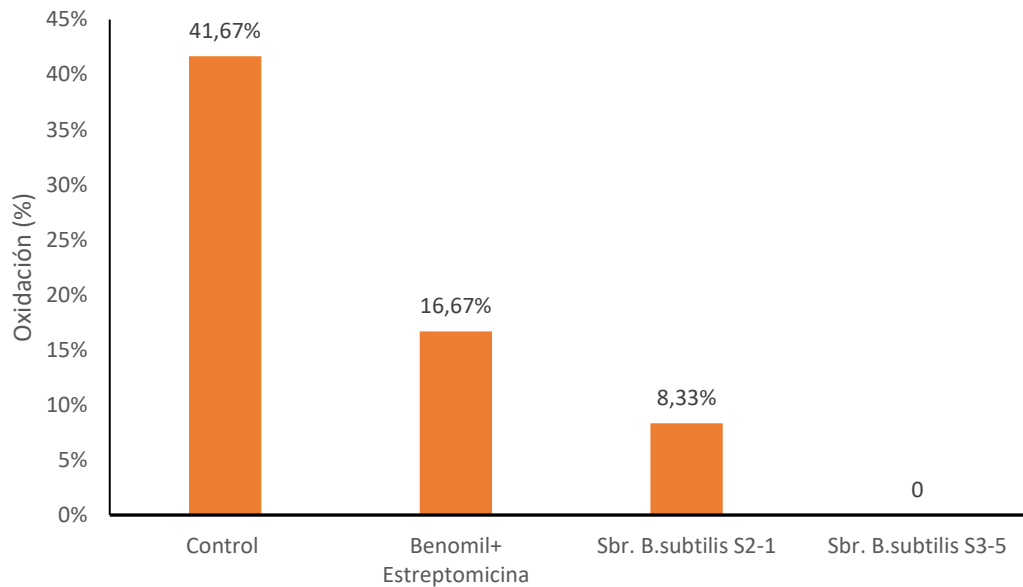


Nota. Autoría propia

En la (Figura 11) se puede observar que la menor contaminación bacteriana se obtuvo con los sobrenadantes de la cepa *B. subtilis* S3-5, seguido del tratamiento con Benomil + Estreptomicina con una contaminación del 8.33% y finalmente el control que tuvo una contaminación de 16.67%.

Figura 12

Porcentaje de oxidación de los microexplantes de V. myrtillus. en medio Murashige and Shook modificado, luego de 45 días de la introducción, en condiciones controladas a 20 °C de temperatura con 16 horas de luz y 6 de oscuridad, dentro de una incubadora.

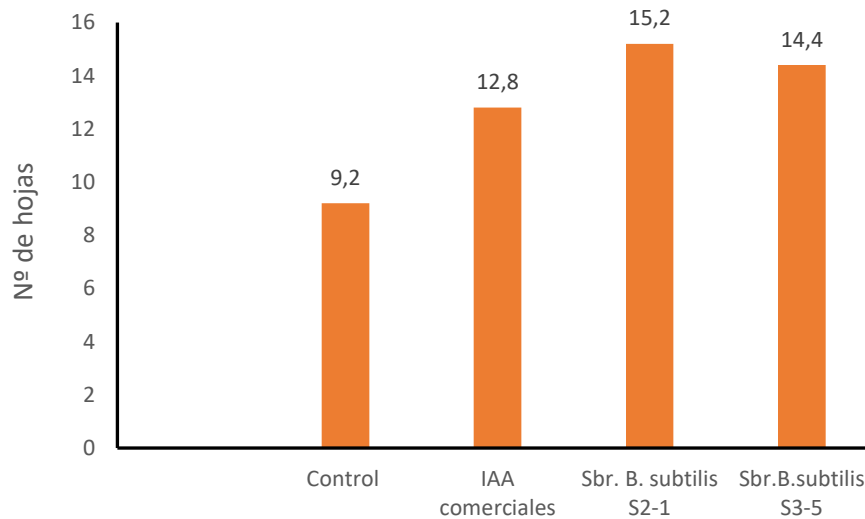


Nota. Los datos se tomaron a los 45 días después de la fase de introducción. Autoría propia.

En la Figura 12, se puede evidenciar que el sobrenadante de *B. subtilis S3-5*, no presenta oxidación siendo el mejor tratamiento, seguido del sobrenadante de *B. subtilis S2-1* que tiene un porcentaje de oxidación de 8.33%, y a continuación el carbón activado con un porcentaje del 16,67%; comparado con el testigo con un 41.67% de oxidación en los explantes.

Figura 13

Medias el número de hojas de los brotes de los microexplantes de V. myrtillus, luego de 45 días de la introducción, en condiciones controladas dentro de una incubadora.



Nota. Autoría propia.

Se puede observar en la (Figura 13) que los tratamientos con mayor número de hojas, fueron los que recibieron sobrenadantes, las cepas S2-1 con una media de 15.2, seguido de la cepa S3-5 con una media de 14.9, comparado con el control que tuvo menor número de hojas con una media de 9,2.

Se puede observar en la Tabla 3 que la media de las alturas de los brotes de *V. myrtillus*, no muestran diferencias significativas luego del día 15 de la introducción, mientras que transcurridos 30 y 45 día la diferencia fue significativa entre tratamientos. Tal es caso en el día 45, el tratamiento con AIA comercial tuvo una media mayor en altura con 48,17mm, seguido del sobrenadante de la cepa S2-1 con 39.83 mm, finalmente el control y el sobrenadante de la cepa S3-5, no presentaron diferencia con medias de altura de 29.5mm y 28.67mm, respectivamente.

Tabla 3

Media \pm desviación estándar de la altura (mm) en brotes de microexplantes de *V. myrtillus* en condiciones in vitro.

Tratamientos	Día 15			Día 30			Día45		
	Media	\pm	D.E.	Media	\pm	D.E.	Media	\pm	D.E.
T1: AIA comercial	7,42	\pm	1,16 ^a	29,08 ^c	\pm	2,78	48,17 ^c	\pm	3,61
T2: Sbr. S2-1	7,83	\pm	2,92 ^a	23,25 ^b	\pm	2,63	39,83 ^b	\pm	3,33
T3: Sbr. S3-5	6,92	\pm	2,02 ^a	18,75 ^a	\pm	2,9	28,67 ^a	\pm	1,92
T0: Control	6,00	\pm	1,04 ^a	17,92 ^a	\pm	2,71	29,5 ^a	\pm	2,07

Nota. Medidas con letras diferentes pertenecen a grupos estadísticamente diferentes. Los valores después del signo \pm corresponden a la desviación estándar. Autoría propia.

Tabla 4

Prueba Tukey del peso fresco (mg) de los brotes de microexplantes de *V. myrtillus* en condiciones in vitro

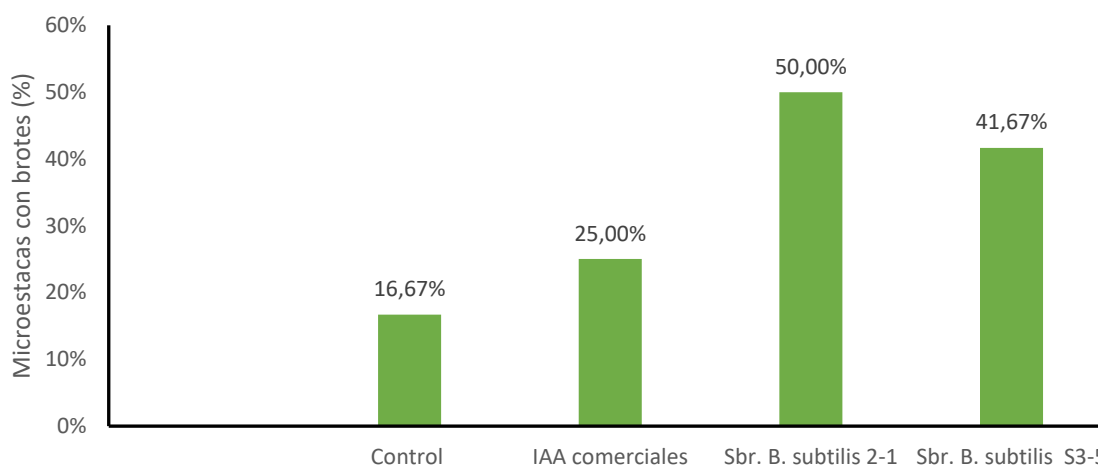
Tratamiento	Medias	n	
Control	33,33	3	A
Sbr. B.subtilis S3-5	61,75	3	B
Sbr. B. subtilis S2-1	70,08	3	B
AIA comercial	98,42	3	C

Nota. Letras con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Donde n es la cantidad de muestras Autoría propia. por tratamiento.

Se puede observar en la Tabla 4 que el mayor peso fresco de los explantes se obtuvo con el tratamiento AIA comercial, con una media de 98.42 mg, seguido de los tratamientos con sobrenadantes de las cepas S2-1 y S3-5 con una media en el peso de 70.08 mg y 61.75 mg, finalmente el control con una media de 33,33 mg.

Figura 14

Presencia de brotes provenientes de microexplantes de V. myrtillus con. en medio Murashige and Shook modificado o por efecto del tratamiento con sobrenadantes de B. subtilis.



Nota. El número de brotes presentes en cada uno de los explantes fue de solo 1, en todos los tratamientos. Autoría propia.

En la (Figura 14) podemos observar que los tratamientos con mayor porcentaje de brotes fueron los sobrenadantes de *B. subtilis* de las cepas S2-1 y S3-5 con un 50% y 41.67% respectivamente, seguidos por el tratamiento con AIA comercial con un 25%, finalmente el control con 16,67%.

Discusión

La cantidad de AIA obtenidas en las muestras de sobrenadante *B. subtilis* S3-5 y S2-1 fue de 2.46 ppm y 3.41 ppm respectivamente (Figura 9), producto de la fermentación con cada bacteria en medio de bajo coste. Resultados similares obtuvieron (Anguiano *et al.*, 2017) quienes encontraron una concentración de auxinas en las cepas de *B. subtilis* de 2,78 ppm para la cepa BS8 y 2,59 ppm para BS14. La detección de auxinas en las cepas de *B. subtilis* demostraron que estos microorganismos son capaces de producir AIA en cantidades adecuadas para promover el crecimiento de las plantas, a más de reducir significativamente la incidencia o severidad de diversas enfermedades en los cultivos, Falconí & Yáñez-Mendizábal (2022); Yáñez-Mendizábal & Falconí (2021); Yáñez-Mendizábal & Falconí (2018).

La suma del porcentaje de la contaminación por hongos y bacterias fue de 50% sin la aplicación de tratamientos con sobrenadante de *B. subtilis* (Figura 10 y 11), resultados similares a los obtenidos por, Brenes & Matamoros (2015) en la micropropagación de diferentes variedades de arándano (*Vaccinium spp.*) en donde el promedio de segmentos nodales contaminados fue de 44%, sin la utilización de fungicidas y bactericidas. La utilización de sobrenadantes de bacterias PGPR representan una alternativa muy viable para reducir considerablemente la contaminación en el cultivo de tejidos.

Los mejores tratamientos para el control de contaminación fúngica y bacteriana, fueron el sobrenadante de *B. subtilis* S3-5 que redujo completamente la presencia de hongos y bacterias en el medio cultivo, y del sobrenadante de la cepa S2-1, que redujo completamente la presencia de bacterias (Figura 11), además disminuyó en un 91.67% la contaminación por hongos (Figura 10), resultados superiores incluso a la aplicación de Benomil y Estreptomycin. Estos resultados coinciden con Amiri *et al.* (2022) quienes utilizaron el sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* ABRIINW.N8 en las diferentes etapas de micropropagación de *Rosa damascena* Mill y concluyeron que el probiótico producido por *Lactobacillus plantarum* ABRIINW.N8 elimina por completo la contaminación fúngica y bacteriana siendo más efectivo que cefaloxine y tetraciclina juntos. Además, Yáñez-Mendizábal & Falconí (2018), demostraron que el sobrenadante de *B. subtilis* tiene propiedades antifúngicas y antibióticas por la presencia de lipopéptidos antifúngicos. A través de TLC

encontraron lipopéptidos de fengicina, iturina y surfactina, demostrando que la fuerte actividad antifúngica se debe a los lipopéptidos de fengicina.

La oxidación se redujo por completo con el sobrenadante de la cepa *B. subtilis* S3-5, y con el sobrenadante *B. subtilis* S2-1 se redujo en un 91.67% (Figura 12), dichos valores coinciden con Padró *et al.* (2021) quienes realizaron la aplicación de la bacteria in vivo en injertos de tomate logrando un éxito del 95%, además ellos mencionan que *B. subtilis* es capaz de neutralizar el 100% de los radicales libres, lo que sugiere que sus propiedades antioxidantes pueden ayudar a reducir el nivel de estrés oxidativo asociado con las lesiones mecánicas creadas durante el injerto y las diferentes etapas fisiológicas. Otros estudios conducidos por AlGhuri *et al.* (2016) informan que los fermentados de ambas cepas *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 y *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 tienen actividades antioxidantes y protectoras del ADN. Finalmente Giri *et al.* (2019) mencionan que los microorganismos también son fuentes potenciales de antioxidantes naturales, incluidos varios productos fermentados de especies de *Aspergillus*, *Rhizopus* y *B. subtilis*. Los Biosurfactantes derivados de *B. subtilis* VSG4 o *B. licheniformis* VS16 exhibieron una capacidad antioxidante satisfactoria, como lo revelaron los ensayos de eliminación de radicales hidroxilos y 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) causantes de la oxidación.

El mayor número de hojas se obtuvo con los sobrenadantes de las cepas S2-1, seguido de la cepa S3-5 siendo mayores al control y al tratamiento con auxinas comerciales (Figura 13). Esto sugiere la presencia de citoquininas en los sobrenadantes de *B. subtilis* como mencionan Sorokan *et al.* (2021) quienes mostraron que la cepa endofítica *Bacillus subtilis*26D (Cohn) es capaz de secretar 0.150 µg/ml de citoquininas en el medio de cultivo. Además Sosnowski *et al.* (2019) mencionan que la citoquinina aplicada durante la etapa vegetativa de *Medicago x varia* T. Martyn aumentó el número de hojas, pero su tamaño fue más pequeño, lo que resulta en una menor masa y peso. Finalmente Schuchovski & Biasi (2019), utilizaron la concentración más baja, de 0.55 ZEA (citoquinina) µg/ml, misma que promovió el mayor número de hojas, que fue 10,0 hojas por brote. Valores similares obtenidos en nuestro estudio (Figura 13).

En la Figura 14 podemos observar que los tratamientos con mayor porcentaje de brotes fueron los que recibieron sobrenadantes de *B. subtilis* de las cepas S2-1 y S3-5. Esto puede ser gracias a la presencia de

citoquininas en los sobrenadantes de *B.subtilis*, como mencionan Schuchovski & Biasi (2019), quienes utilizaron la concentración más baja, de 0.55 ZEA (citoquinina) $\mu\text{g}/\text{m}$ en la micropropagación de *V. myrtillus* *Rabbiteye*, y promovieron la formación de brotes nuevos (81,3%). Esta concentración produjo un número de 1,3 brotes nuevos. Valores cercanos con nuestro estudio.

Se puede observar en la Tabla 3 que luego del día 45, el tratamiento con AIA comercial tuvo la media mayor en altura con 48,17mm, seguido del sobrenadante de la cepa S2-1 con 39.83 mm. Esto ocurre porque en el sobrenadante existe la presencia de citoquininas que promueven la formación de brotes, sin embargo, disminuye su tamaño lo que concluyen Brissette *et al.* (1990) en la micropropagación de *V. myrtillus* *Lowbush* cuando existe mayor presencia de brotes axilares, la longitud de los mismos disminuye.

Se puede evidenciar en la Tabla 3 que el control y el sobrenadante de la cepa S3-5, no presentan diferencia significativa con unas medias de altura de 29.5mm y 28.67mm respectivamente. Esto puede suceder porque las concentraciones de auxinas o citoquininas no son las adecuadas como mencionan Cabello *et al.* (2019) La concentración de fitohormonas debe ser adecuada, ya que la deficiencia o exceso de ellas inhibe el crecimiento vegetal. En el caso de nuestro estudio, es por la dosis de citoquininas en el sobrenadante las mismas que son desconocidas.

Se puede observar en la Tabla 4 que el mejor tratamiento es el que se utiliza el AIA comercial dándonos como resultado una media del peso fresco de 98.42 mg, seguido de los tratamientos con sobrenadantes de las cepas S2-1 y S3-5 con una media en el peso de 70.08 mg y 61.75 mg.

Aunque los sobrenadantes tengan el mayor número de hojas en comparación con el resto de tratamientos, el tamaño es menor como mencionan. Sosnowski *et al.* (2019) que la citoquinina aplicada durante la etapa vegetativa de *Medicago x varia T. Martyn* aumentó el número de hojas, pero su tamaño es más pequeño, lo que resulta en una menor masa y peso. Además Xiao-Ping & Xi-Gui (2006) mencionan que las respuestas de las estomas a las citoquininas dependen de la variedad y concentración de las citoquininas, puede ocasionar la apertura de las estomas en la oscuridad, produciendo una pérdida de agua y por ende un menor peso en fresco.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- El sobrenadante de *B. subtilis* S3-5 tuvo un efecto positivo al reducir por completo la presencia de hongos y bacterias, demostrando que es una alternativa factible para sustituir bactericidas y fungicidas químicos, en el cultivo in vitro, que son muy utilizados en la fase de introducción especialmente en microexplantes de plantas leñosas que son más susceptibles a la contaminación.
- El efecto antioxidante de sobrenadantes de *B. subtilis* S3-5 fue superior e incluso más beneficioso que el carbón activado, ya que este compuesto no solo absorbe los fenoles producidos por los microexplantes si no también es parte de los reguladores de crecimiento y nutrientes presentes en el medio de cultivo.
- Los sobrenadantes de *B. subtilis* de la cepa S2-1 y S3-5 suplementados en el medio de cultivo, tuvieron un impacto positivo en generar brotes y en el número de hojas, de los microexplantes de *V. myrtillus*, en comparación con el tratamiento suplementado con AIA comercial, por tanto, los sobrenadantes de *B. subtilis* se pueden utilizar como una fuente de biocontrol y una alternativa para el uso de fitohormonas, por su capacidad bioestimulante en el cultivo de tejidos vegetales.

Recomendaciones

- Continuar con el seguimiento de las plantas micropropagadas con sobrenadante de *B. subtilis* S2-1 y S3-5 hasta llegar a su etapa adulta, para identificar su resistencia a plagas, enfermedades, tolerancia al estrés biótico y abiótico; además de su productividad.
- Identificar y cuantificar los metabolitos secundarios presentes en el sobrenadante de *B. subtilis* S2-1 y S3-5, para identificar sus beneficios en otros campos de la ciencia.
- Realizar más ensayos en las cuatro etapas de micropropagación de diferentes especies vegetales leñosas.
- Realizar un análisis económico, de la utilización del sobrenadante de *B. subtilis* S3-5 en biofábricas dedicadas al cultivo de tejidos vegetales.

Bibliografía

- Abdel-aziz, S. M., Mouafi, F. E., & Keera, A. A. (2013). Extracellular Metabolites Produced by a Novel Strain *Bacillus alvei* NRC-14 : 6 . Heat-Shock Stress Induces Production of Antimicrobial Metabolites. *J. Basic. Appl. Sci. Res*, 3(12), 410–420.
- AlGhuri, A., Volski, A., Cugini, C., Walsh, E. M., Chistyakov, V. A., Mazanko, M. S., Bren, A. B., Dicks, L. M. T., & Chikindas, M. L. (2016). Safety Properties and Probiotic Potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Advances in Microbiology*, 06(06), 432–452. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.66043>
- Almeida, L., Borges, N. A., Moreira, L. D. S. G., Resende Teixeira, K. T., Carraro-Eduardo, J. C., Dai, L., Stenvinkel, P., Lindholm, B., & Mafra, D. (2019). Cranberries – potential benefits in patients with chronic kidney disease. *Food & Function*, 10(6), 3103–3112. <https://doi.org/10.1039/C9FO00375D>
- Amiri, S., Mohammadi, R., & Nami, Y. (2022). *Lactobacillus plantarum* ABRIINW.N8 eliminates fungal and bacterial contamination and promotes shoot proliferation and root induction in plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 2022*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/S11240-022-02406-1>
- Anguiano Cabello, J., Flores Olivas, A., Olalde Portugal, V., Arredondo Valdés, R., & Laredo Alcalá, E. (2019). Evaluation of *Bacillus subtilis* as promoters of plant growth. *Revista Bio Ciencias*, 6(844), 1–13. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e418>
- Anguiano-Cabello, J. C., Flores-Olivas, A., Ochoa-Fuentes, Y. M., Arredondo-Valdés, R., & Olalde-Portugal, V. (2017). Fast Detection of Auxins by Microplate Technique. *American Journal of Plant Sciences*, 08(02), 171–177. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.82013>
- Arkhipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., & Kudoyarova, G. R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil* 2005 272:1, 272(1), 201–209. <https://doi.org/10.1007/S11104-004-5047-X>

- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, 378(1–2), 1–33. <https://doi.org/10.1007/S11104-013-1956-X/FIGURES/5>
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/S11274-011-0979-9>
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Plant tissue culture: An introductory text. In *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
- Brenes Angulo, C., & Matamoros, C. (2015). MICROPROPAGACIÓN DE CUATRO CULTIVARES DE ARÁNDANO (*Vaccinium* spp.) A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE DOS PROCEDENCIAS. *Agronomía Costarricense*, 39(1), 7–23. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43638524001>
- Brissette, L., Tremblay, L., & Lord, D. (1990). Micropropagation of Lowbush Blueberry from Mature Field-grown Plants. *HortScience*, 25(3), 349–351. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.25.3.349>
- Cabello, J. C., Flores-Olivas, A., Ochoa-Fuentes, Y. M., Arredondo-Valdés, R., Olalde-Portugal, V., Anguiano-Cabello, (2017). Fast Detection of Auxins by Microplate Technique. *American Journal of Plant Sciences*, 8(2), 171–177. <https://doi.org/10.4236/AJPS.2017.82013>
- Cassells, A. C. (2012). Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture: Phytopathogens, vitro pathogens, and vitro pests. *Methods in Molecular Biology*, 877, 57–80. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_6/COVER
- Chanway, C. P., & Nelson, L. M. (1991). Tissue culture bioassay for plant growth promoting rhizobacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(4), 331–333. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90187-O](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90187-O)
- Cleves Leguízamo, J. A. (2021). Fundamentos técnicos del cultivo del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en la región central de Colombia. In *Fundamentos técnicos del cultivo del arándano (Vaccinium corymbosum L.) en la región central de Colombia*. <https://doi.org/10.19053/9789586604895>

- Cochard, B., Giroud, B., Crovadore, J., Chablais, R., Arminjon, L., & Lefort, F. (2022). Endophytic PGPR from Tomato Roots: Isolation, In Vitro Characterization and In Vivo Evaluation of Treated Tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Microorganisms*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040765>
- Debnath, S., & McRae, K. (2010). In Vitro Culture of Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). Http://Dx.Doi.Org/10.1300/J301v01n03_02, 1(3), 3–19. https://doi.org/10.1300/J301V01N03_02
- El productor. (2019). *Impulsan producción de arándanos en Tungurahua | Noticias Agropecuarias*. Obtenido de <https://elproductor.com/2021/01/ecuador-impulsan-produccion-de-arandanos-en-tungurahua/>
- Falconí, C. E., & Yáñez-Mendizábal, V. (2022). Available Strategies for the Management of Andean Lupin Anthracnose. In *Plants* (Vol. 11, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11050654>
- Fan, S., Jian, D., Wei, X., Chen, J., Beeson, R. C., Zhou, Z., & Wang, X. (2017). *Micropropagation of blueberry “Bluejay” and “Pink Lemonade” through in vitro shoot culture*. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.052>
- Flores Olivas, A., Cabello, A., Olivas, F., Portugal, O., Valdés, A., & Alcalá, L. (2019). Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* como promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Bio Ciencias*, 6, 418. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e418>
- García, L. M. D., & Sánchez, R. A. H. (2016). Multiplicación clonal in vivo e in vitro de la especie forestal nativa *Aniba perutilis* Hemsl. *Acta Agronomica*, 65(2), 190–196. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n2.42808>
- Giri, S. S., Ryu, E. C., Sukumaran, V., & Park, S. C. (2019). Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains. *Microbial Pathogenesis*, 132, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.035>
- Gómez, A., & Abdelnour, A. (2013). Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). *Revista Tecnología En Marcha*, 26(4), 64. <https://doi.org/10.18845/tm.v26i4.1584>
- Kargapolova, K. Y., Burygin, G. L., Tkachenko, O. V., Evseeva, N. V., Pukhalskiy, Y. V., & Belimov, A. A. (2020). Effectiveness of inoculation of in vitro-grown potato microplants with rhizosphere bacteria of the genus *Azospirillum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 141(2), 351–359. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01791-9>

- Keswani, C., Singh, S. P., Cueto, L., García-Estrada, C., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. R., Borriss, R., Singh, S. P., Blázquez, M. A., & Sansinenea, E. (2020). Auxins of microbial origin and their use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(20), 8549–8565. <https://doi.org/10.1007/S00253-020-10890-8>
- Larraburu, E. E., Carletti, S. M., Rodríguez Cáceres, E. A., & Llorente, B. E. (2007). Micropropagation of photinia employing rhizobacteria to promote root development. *Plant Cell Reports*, *26*(6), 711–717. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0279-2>
- Leite, M. S., Pinto, T. E. F., Centofante, A. R., Neto, A. R., Silva, F. G., Selari, P. J. R. G., & Martins, P. F. (2021). Acclimatization of *Pouteria gardeneriana* Radlk micropropagated plantlets: Role of in vitro rooting and plant growth-promoting bacteria. *Current Plant Biology*, *27*, 100209. <https://doi.org/10.1016/J.CPB.2021.100209>
- Lim, J.-H., & Kim, S.-D. (2009). Synergistic plant growth promotion by the indigenous auxins-producing PGPR *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* *2003* *52*:5, *52*(5), 531–538. <https://doi.org/10.3839/JKSABC.2009.090>
- Pace, L., Pellegrini, M., Palmieri, S., Rocchi, R., Lippa, L., & Del Gallo, M. (2020). Plant growth-promoting rhizobacteria for in vitro and ex vitro performance enhancement of Apennines' Genepì (*Artemisia umbelliformis* subsp. *eriantha*), an endangered phytotherapeutic plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *56*(1), 134–142. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10035-1>
- Padró, M. D. A., Caboni, E., Morin, K. A. S., Mercado, M. A. M., & Olalde-Portugal, V. (2021). Effect of *Bacillus subtilis* on antioxidant enzyme activities in tomato grafting. *PeerJ*, *9*. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.10984/SUPP-10>
- Petti, C. (2020). Phloroglucinol Mediated Plant Regeneration of *Ornithogalum dubium* as the Sole “Hormone-Like Supplement” in Plant Tissue Culture Long-Term Experiments. *Plants (Basel, Switzerland)*, *9*(8), 1–15. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9080929>
- Retamales, J. & Hancock, J. (2012). *Blueberries*.

- Sajjad Mirza, M., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., & Malik, K. A. (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*, *237*(1), 47–54. <https://doi.org/10.1023/A:1013388619231>
- Schuchovski, C. S., & Biasi, L. A. (2019). In Vitro Establishment of ‘Delite’ Rabbiteye Blueberry Microshoots. *Horticulturae* 2019, Vol. 5, Page 24, *5*(1), 24. <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE5010024>
- Sharry, S. (2020). Plantas de probeta. *Plantas de Probeta*. <https://doi.org/10.35537/10915/46738>
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2013). Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. In *Embrapa*. Universidad de la Plata.
- Sorokan, A., Veselova, S., Benkovskaya, G., & Maksimov, I. (2021). Endophytic Strain *Bacillus subtilis* 26D Increases Levels of Phytohormones and Repairs Growth of Potato Plants after Colorado Potato Beetle Damage. *Plants (Basel, Switzerland)*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/PLANTS10050923>
- Sosnowski, J., Malinowska, E., Jankowski, K., Król, J., & Redzik, P. (2019). An estimation of the effects of synthetic auxin and cytokinin and the time of their application on some morphological and physiological characteristics of *Medicago x varia* T. Martyn. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(1), 66–73. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2016.12.023>
- Vander, K. (1988). *The Genus Vaccinium*. https://www.npss.sk.ca/docs/2_pdf/The_Genus_Vaccinium_in_North_America.pdf
- Viss, P. R., Brooks, E. M., & Driver, J. A. (1991). A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *27*(1), 42–42. <https://doi.org/10.1007/BF02632060>
- Xiao-Ping, S., & Xi-Gui, S. (2006). Cytokinin- and auxin-induced stomatal opening is related to the change of nitric oxide levels in guard cells in broad bean. *Physiologia Plantarum*, *128*(3), 569–579. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.2006.00782.X>
- Yáñez-Mendizábal, V., & Falconí, C. E. (2018). Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on Andean lupin seeds by lipopeptide production. *Biological Control*, *122*, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.004>

Yáñez-Mendizábal, V., & Falconí, C. E. (2021). *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 induces systemic resistance against anthracnose in Andean lupin by lipopeptide production. *Biotechnology Letters*, 43(3), 719–728. <https://doi.org/10.1007/S10529-020-03066-X>

Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., & Teixidó, N. (2012). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control*, 60(3), 280–289. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2011.12.001>