



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

TEMA:

Elicitación de vitroplantas de *Vaccinium corymbosum* para la producción de polifenoles

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de ingeniera en Biotecnología

Línea de investigación: Biotecnología, energía y recursos naturales renovables

AUTORA:

Samantha Valeria Quimbia Loyo

DIRECTORA:

Ing. Tania Salome Sulca Villamarín. PhD

Ibarra – Ecuador 2025



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1003743315		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Quimbia Loyo Samantha Valeria		
DIRECCIÓN:	Malchinguí		
EMAIL:	valeriasql88@gmail.com/svquimbial@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:		TELÉFONO MÓVIL:	0997980969

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Elicitación de vitroplantas de <i>Vaccinium corymbosum</i> para la producción de polifenoles.
AUTORA:	Quimbia Loyo Samantha Valeria
FECHA:	16/07/2025
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TITULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Andrea Jazmín Chiliquinga Quispe. MSc / Ing. Tania Salome Sulca Villamarín. PhD

2. **CONSTANCIAS**

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin los derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 16 días del mes de Julio del 2025

AUTORA



.....
Quimbia Loyo Samantha Valeria

C.C.: 1003743315

**CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE
INTERGRACIÓN CURRICULAR**

Ibarra, 16 de Julio de 2025.

Ing. Tania Salome Sulca Villamarín. PhD
DIRECTOR/A DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.



Ing. Tania Salome Sulca Villamarín. PhD

C.C.: 1719083717

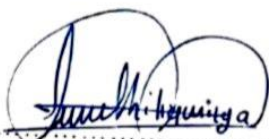
APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificado del trabajo de Integración Curricular "ELICITACIÓN DE VITROPLANTAS DE *Vaccinium corymbosum* PARA LA PRODUCCIÓN DE POLIFENOLES." elaborado por SAMANTHA VALERIA QUIMBIA LOYO, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:



.....
Ing. Tania Salome Sulca Villamarín. PhD

C.C.: 1719083717



.....
Ing. Andrea Jazmín Chiliquinga Quispe. MSc

C.C.: 1720064193

PRESENTACIÓN

Yo, SAMANTHA VALERIA QUIMBIA LOYO con el número de identidad C.C.: 1003743315 en calidad de autora de la Tesis Titulada “ELICITACIÓN DE VITROPLANTAS DE *Vaccinium corymbosum* PARA LA PRODUCCIÓN DE POLIFENOLES”, me hago responsable de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; y pongo este ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento, Rosa Loyo y Gonzalo Quimbia, por su sacrificio y contante apoyo en cada etapa de mi vida. A mis hermanos y hermanas, junto a respectivas familias, Wilson Quimbia y Martha Yanchaguano, Verónica Quimbia y Luis Flores y Jessica Quimbia, por brindarme el apoyo para lograr este objetivo.

LISTA DE SIGLAS.

FEPEXA: Federación Ecuatoriana de Productores y Exportadores de Arándano en el Ecuador

WPM: Medio Woody Plant

2-iP: N6-(delta 2-isopentenil)-adenina)

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTERGRACIÓN CURRICULAR	4
APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR.....	1
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	5
CAPÍTULO I	9
1.1 Planteamiento del problema.....	9
1.2 Justificación	9
1.3 Objetivos.....	10
1.3.1 Objetivo general.	11
1.3.2 Objetivos específicos	11
1.4 Pregunta de investigación	11
CAPÍTULO II	12
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Generalidades de <i>Vaccinium corymbosum</i>	12
2.2. Importancia de <i>Vaccinium corymbosum</i> en el Ecuador.....	12
2.3. Metabolitos secundarios en <i>V. corymbosum</i>	12
2.3.1. Polifenoles	13
2.4. Elicitación	13
CAPÍTULO III.....	15
3. METODOLOGÍA	15
3.1 Descripción del área de estudio	15
3.2 Ejecución del primer objetivo.....	15
3.2.1 Etapa preliminar: Desinfección, brotación y Elongación	15
3.2.2 Subcultivos	16
3.2.3 Extracción y cuantificación de Polifenoles	18
3.3 Ejecución del segundo objetivo	20
3.3.1 Producción de Polifenoles mediante estrés lumínico.....	20
CAPÍTULO IV.....	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1. Actividad preliminar: Elongación.....	22
4.2. Producción de polifenoles totales de acuerdo con el subcultivo	23
4.3. Producción de polifenoles totales por elicitación lumínica.....	25
CAPÍTULO V	28
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	28
5.1. Conclusiones.....	28
5.2. Recomendaciones	28
REFERENCIAS.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Cortes en las micro estacas para la etapa de elongación. A) es el brote obtenido del proceso de desinfección y siembra en el medio de brotación después de 4 semanas. B), corte transversal en la base de la micro estaca previo a la siembra en el medio de elongación.</i>	16
Figura 2.	<i>Cortes en las vitroplantas para los procesos de subcultivo. A) Corte en la base de la yema axilar para obtener el explante para el primer subcultivo. B) corte en base del expante para quitar tejido vegetal necrosado y callos, y otro corte transversal en la mitad de la planta para tener explantes de 5 cm, para posteriores cultivos.....</i>	18
Figura 3.	<i>Metodología de extracción y cuantificación de polifenoles. A) material vegetal cortado, B) muestras maceradas y centrifugas con los solventes de extracción previo a la revelación, C) revelación de polifenoles totales mediante el método del Folin-Ciocalteau.</i>	19
Figura 4.	<i>Cámaras elicitación lumínica para la producción de polifenoles.....</i>	20
Figura 5.	<i>Concentración de los polifenoles totales, según la interacción del tiempo y los subcultivos. Con una significancia del ANOVA de $p < 0.05$. La barra de color gris representa la media con la concentración más alta de polifenoles en cuanto a los tratamiento.</i>	25
Figura 6.	<i>Concentración de los polifenoles totales, según el tiempo de elicitación lumínica.</i>	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Tratamientos establecidos para la extracción de polifenoles por subcultivos.	18
Tabla 2.	Tratamientos establecidos para la elicitación de polifenoles por estrés lumínico.	21

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	<i>Curva de calibración con el Ácido Gálico.....</i>	36
Anexo 2.	<i>Análisis de varianza de la cuantificación de polifenoles totales en los subcultivos</i>	36
Anexo 3.	<i>Resultados de la prueba de Tukey al 5% de los tratamientos utilizados en la extracción y cuantificación de polifenoles totales.</i>	36
Anexo 4.	<i>Análisis de la varianza de la cuantificación de polifenoles totales en la elicitación lumínica.</i>	37
Anexo 5.	<i>Resultados de la prueba de Tukey al 5% de los tratamientos utilizados en la extracción y cuantificación de polifenoles totales.</i>	37

RESUMEN

El arándano (*Vaccinium corymbosum*) es ampliamente cultivado en Ecuador y valorado principalmente por sus bayas ricas en antioxidantes. No obstante, otras partes de la planta como hojas y tallos suelen desaprovecharse durante las podas debido a la poca información que se tiene sobre su potencial para la obtención de compuestos bioactivos, especialmente polifenoles. Estos compuestos conocidos por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antidiabéticas han generado un creciente interés en la industria nutracéutica. Y los residuos vegetales de *V. corymbosum* podrían representar una fuente alternativa y sostenible. En este contexto, la presente investigación evaluó la producción de polifenoles totales en vitroplantas de *V. corymbosum*, aplicando una elicitación por subcultivos y una exposición a diferentes longitudes de onda de luz visible. Los resultados indicaron que el mejor tratamiento en subcultivos fue el subcultivo 4 en la semana 1, con una concentración de 57.69mgGAE/g PS. En cuanto a los tratamientos lumínicos, el mayor contenido de polifenoles se obtuvo con el tratamiento control con luz blanca durante 120 horas en el subcultivo 4, con 50.17mgGAE/g PS, superando a los tratamientos con luz LED roja (660nm) y azul (380-500nm). Estos hallazgos sugieren que el aprovechamiento de residuos vegetales de *V. corymbosum* podría ser una estrategia viable para la producción de compuestos nutracéuticos de alto valor dándole un plus económico a este cultivo en el Ecuador.

Palabras clave: Residuos, Elongación, subcultivos, longitudes de onda, polifenoles totales, vitroplantas.

ABSTRACT

Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) is widely cultivated in Ecuador and valued primarily for its antioxidant-rich berries. However, other parts of the plant, such as leaves and stems, are often wasted during pruning due to limited information on their potential for obtaining bioactive compounds, especially polyphenols. These compounds, known for their antioxidant, anti-inflammatory, and antidiabetic properties, have generated growing interest in the nutraceutical industry. *V. corymbosum* plant residues could represent an alternative and sustainable source. In this context, the present study evaluated total polyphenol production in *V. corymbosum* vitro plants, applying subculture elicitation and exposure to different wavelengths of visible light. The results indicated that the best subculture treatment was subculture 4 at week 1, with a concentration of 57.69mgGAE/g DW. Regarding light treatments, the highest polyphenol content was obtained with treatment white light control for 120 hours in subculture 4, with 50.17mgGAE/g DW, surpassing treatments with red (660nm) and blue (380-500nm) LED light. These findings suggest that the utilization of *V. corymbosum* plant residues could be a viable strategy to produce high-value nutraceutical compounds, providing an economic advantage to this crop in Ecuador.

Keywords: Waste, Elongation, subcultures, wavelengths, total polyphenols, vitroplants.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

La producción de metabolitos secundarios a partir de plantas silvestres presenta desafíos para un escalado industrial debido a la baja concentración de bioactivos presentes en las mismas, a causa de factores como las limitaciones ambientales, regionales y la variabilidad genética. Las plantas de *Vaccinium corymbosum* pueden ser una fuente potencial de ciertos metabolitos secundarios como los polifenoles. En Ecuador, las plantas de *V. corymbosum* son cultivadas durante todo el año y, según la Federación Ecuatoriana de Productores y Exportadores de Arándano en el Ecuador (FEPEXA) se cultivan más de 300 hectáreas. Sin embargo, solo se aprovecha las bayas, con un 80% para consumo regional y solo un 20% para exportación. En el 2024, se exportó 750 toneladas equivalentes a USD 3.9 millones. Aunque las bayas son conocidas por sus propiedades antioxidantes, los productores desconocen sobre los bioactivos que presentan las otras partes de la planta de *V. corymbosum*, que pueden ser aprovechados para generar productos de valor agregado. Durante su vida productiva de 10 a 15 años, los productores aplican estrategias como la poda para mejorar la calidad de las bayas, lo que resulta en la pérdida de material vegetal valioso, que podría usarse para extraer bioactivos con potencial nutracéutico y generar productos de valor agregado como píldoras, tes, aditivos de alimentos, entre otras. (Debnath-Canning et al., 2020; Ștefănescu et al., 2020; Han, T., & Miao, G. 2024; Czernicka et al., 2024).

1.2 Justificación

Las bayas de *V. corymbosum* en los últimos años se las considera como un “super alimento” por sus propiedades nutracéuticas atribuidas a su composición fenólica dándole un potencial antioxidante, antidiabética y antiinflamatoria (Hashim et al., 2021; Rana et

al., 2022). La expansión de este cultivo en el país genera un aumento en la masa vegetal residual radicando en buscar un aprovechamiento de estos, como hojas y tallos generados en el mantenimiento del cultivo a lo largo de su vida productiva. La industria nutracéutica está adoptando innovaciones biotecnológicas para optimizar la biodisponibilidad de estos compuestos fenólicos (Kalt et al., 2020; Yang et al., 2021; Felgus-Lavefve, 2022; Onuh et al., 2023).

Es así, que plantear la idea de gestionar los residuos del material vegetal de las plantas de *V. corymbosum* permite darle un plus económico al aprovechar bioactivos presentes como los polifenoles. Aunque se dispone de poca información que asevera la presencia de polifenoles en las hojas de *V. corymbosum*. Estos han logrado resaltar la presencia de estos compuestos fenólicos, mediante macerado de hojas obtenidas de plantas bajo invernadero y ensayos en laboratorio con vitroplantas, resaltando compuestos como el ácido clorogénico y las antocianinas (Ștefănescu et al., 2020; Czernicka et al., 2024, Andrade, M. 2024).

En este trabajo de investigación se implementó técnicas biotecnológicas como la elicitación en vitroplantas de *V. corymbosum* con inductores como la luz y los subcultivos para evaluar la producción de polifenoles, que son compuestos de interés para la industria nutracéutica, (Ștefănescu et al., 2020). Esto podría ser valorado posteriormente en campo, y así aprovechar los residuos vegetales planta de *V. corymbosum* no solo sus bayas. El presente trabajo de investigación generó información sobre la producción de polifenoles totales en vitroplantas de *V. corymbosum* que puede ser de apoyo para posteriores investigaciones a un mayor escalado (Hashim et al., 2021; Yang et al., 2021; Felgus-Lavefve, 2022; Onuh et al., 2023)

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general.

Evaluar la producción de polifenoles totales de vitroplantas de *Vaccinium corymbosum* expuesto a diferentes procesos de elicitación.

1.3.2 Objetivos específicos

1.3.2.1. Determinar la mejor semana dentro de los subcultivos para la producción de polifenoles totales.

1.3.2.2. Analizar el efecto de diferentes espectros de luz en la producción de polifenoles totales.

1.4 Pregunta de investigación

¿Los subcultivos y aplicación de distintos espectros de luz LED afectan la producción de polifenoles totales en vitroplantas de *V. corymbosum*?

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de *Vaccinium corymbosum*

V. corymbosum comúnmente conocida como arándano es una especie arbustiva autóctona del Norte de América especialmente Canadá y del Sureste de los Estado Unidos (Guo et al., 2019; Mengist et al., 2020). Sin embargo, Ecuador empezó a competir con el cultivo de *V. corymbosum* en el mercado nacional e internacional desde el 2015, con la iniciativa de un pequeño grupo de 23 emprendedores pertenecientes a la Federación Ecuatoriana de Productores y Exportadores de Arándano en el Ecuador (FEPEXA) según el Ministerio de Agricultura y Ganadería (2015). En el país principalmente se manejan las variedades **Biloxi** y **Emerald** (Aldaz et al., 2024).

2.2. Importancia de *Vaccinium corymbosum* en el Ecuador

El género *Vaccinium* en el Ecuador está tomando fuerza por sus propiedades antioxidantes debido a sus componentes fenólicos, siendo atractivo para la industria alimentaria como productos liofilizados y vinos, en la industria textil como tintes naturales, en la farmacéutica como medicamentos antimicrobianos, antioxidantes, entre otros (Caranqui et al., 2022). En el 2024 el país alcanzo \$ 3.9 millones en exportaciones de bayas de *V. corymbosum*. El FEPEXA gestiona 24 empresas productoras de arándano en provincias como Manabí, El Oro y Santa Elena (Aldaz et al., 2024).

2.3. Metabolitos secundarios en *V. corymbosum*

Los metabolitos secundarios con actividad antioxidante son característicos en las bayas de *V. corymbosum* tales como los polifenoles totales. Resaltando grupos como los fenoles, antocianinas, las flavonas que ayudan a modular vías proinflamatorias y reducen el estrés oxidativo, un factor asociado con diversas enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos (Contreras et al., 2015,

Karppinen et al., 2016; Clapa et al., 2022; Felgus-Lavefve, 2022). Además, los polifenoles han mostrado efectos antiinflamatorios, antimicrobianos y moduladores del metabolismo, lo que sugiere su potencial para prevenir y tratar diversas afecciones. En el estudio realizado por Andrade, M. (2024) en *V. corymbosum* variedad Biloxi mediante el uso de cultivo *in vitro*, en medios suplementados con el regulador de crecimiento tipo citoquinina 2-iP (N6-(delta 2-isopentenil)-adenina se obtuvo plántulas de 30 días de edad con un alto contenido de polifenoles según el ensayo de Folin-Ciocalteu realizado.

2.3.1. Polifenoles Totales

Tanto en bayas como en las hojas de *V. corymbosum* se destacan grupos de polifenoles como las antocianinas entre los principales se encuentran cianidina, delphinidina, malvidina y peonidina y dentro de los fenoles se encuentra principalmente el ácido clorogénico (Samkumar et al., 2021; Bertelli et al., 2021; Andrade, M. 2024).

2.4. Elicitación

La elicitación es un método que permite la activación de ciertas vías metabólicas en una planta mediante agentes inductores, sean bióticos o abióticos para desencadenar mecanismos de defensa de la planta. En *V. corymbosum* uno de los principales inductores abióticos es la luz, influyendo en el crecimiento, desarrollo y morfogénesis de la planta a través de su fotosíntesis. Sin embargo, la luz también desempeña un papel crítico en el control de la generación de metabolitos secundarios para lograr la defensa óptima en las plantas (Thakur, M., & Sohal, B. S. 2013). En las bayas de *V. corymbosum* el estrés lumínico se ha implementado para aumentar la producción de compuestos antioxidantes como las antocianinas y polifenoles que son de interés en la industria de alimentos (Nazzaro et al., 2022).

En los últimos años se ha visto el interés de exponer a especies del género *Vaccinium* a distintos espectros de luz para mejorar las características morfológicas y nutricionales de los frutos (Zhang et al., 2022). En estudios realizados por Wei et al., (2023) y Andrade M. (2024), se visualizó un incremento en la concentración de metabolitos secundarios como las antocianinas y algunos polifenoles al ser expuestos a diferentes espectros de luz visible. En un estudio realizado por Hogewoning et al., (2010), mostro el efecto de las luces LED en la ruta de la clorofila y de brotación de las plantas de *V. corymbosum ex vitro e in vitro*. La implementación de luces LED en la agricultura está tomando protagonismo para mejorar las características y procesos agrícolas al momento de producir una planta en espacios limitados (Hashim et al., 2021; Peng et al., 2022).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1 Descripción del área de estudio

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Técnica del Norte, ubicada en el Antiguo Hospital San Vicente de Paúl con las coordenadas UTM (0.346749; -78.113972), en la ciudad de Ibarra provincia de Imbabura.

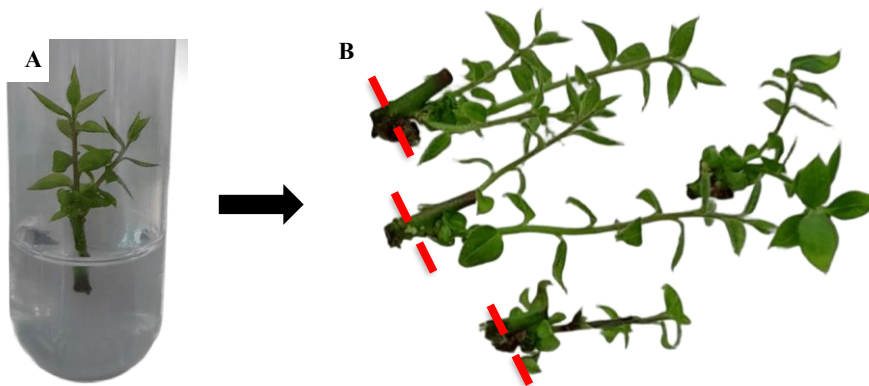
3.2 Ejecución del primer objetivo

3.2.1 Análisis estadístico Etapa preliminar: Desinfección, brotación y Elongación

Se tomó explantes de plantas madre de *V. corymbosum* variedad Biloxi de 18 meses de edad. A las cuales periódicamente, cada 8 días se colocaba 5g/L del fertilizante Quimifol. Para el proceso de desinfección se implementó el protocolo de Casahualpa, P. (2024) modificado. La desinfección se realizó con 26.7g/L de detergente en polvo por 10 min con agitación constante. Seguido se colocaron 66.7mL/L de jabón líquido neutro y 6.7mL/L de Tween 20 con agitación contante por 15min. Consecutivamente se sumergió en alcohol al 70% por 5min con agitación constante. Finalmente se agitó en una solución de cloro al 2% y 6.7mL/L por 18min. Entre cada cambio de solución se aclaró con agua destilada estéril por 1min, en tres ocasiones. Los explantes desinfectados fueron sembrados en el medio Woody Plant (WPM I) propuesto por Casahualpa, P. (2024) para la brotación. Los explantes se mantuvieron en el cuarto de crecimiento a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 27-28% de humedad relativa, con un fotoperiodo de 18h luz:6h oscuridad y una intensidad de luz de $300\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$ por 4 semanas.

Pasado el tiempo de brotación se realizó la etapa de elongación. Se preparó el medio Woody Plant II (WPM II), con el protocolo de Casahualpa, P. (2024) modificado. Se utilizó el medio comercial Lloyd & McCown Woody Plant con vitaminas (WPM), 30g/L de azúcar, 2.4g/L de Gelzan y 2.5mg/L del regulador de crecimiento N6-(delta 2-isopentenil)-adenina (2-iP). Para la siembra se utilizaron plántulas de 3cm obtenidas del proceso de brotación, en las que se efectuó un corte en la base de la micro estaca (Fig. 1). Se sembró 5 plántulas por frasco y fueron cultivadas a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 27-28% de humedad relativa, un fotoperiodo de 18h luz:6h oscuridad y una intensidad de luz de $300\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$. Esta etapa tuvo una duración de 4 semanas.

Figura 1. Cortes en las micro estacas para la etapa de elongación. A) es el brote obtenido de la siembra en el medio de brotación después de 4 semanas. B), corte transversal en la base de la micro estaca previo a la siembra en el medio de elongación.



3.2.2 Subcultivos

Para esta etapa se preparó medio WPM II propuesto por Casahualpa, P. (2024), el cual fue dispensado en frascos de 250mL, 30mL por frasco. Para el proceso de subcultivos se implementó la metodología de Sedlák, J. (2009). Para el primer

subcultivo se tomaron las vitroplantas obtenidas del paso de elongación, se realizó un corte en la base del brote axilar para separar el explante de la estaca principal (Fig. 2), se sembraron 10 explantes por frasco. Los subcultivos se mantuvieron en el cuarto de crecimiento a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 27-28% de humedad relativa, un fotoperiodo de 18h luz:6h oscuridad y una intensidad de luz de $300\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$ durante 5 semanas, siendo la primera semana de adaptación. Para el segundo subcultivo se tomaron las vitroplantas del primer subcultivo, donde se realizó un corte transversal obteniendo explantes iniciales de 4cm de alto y un corte en base del explante para quitar tejido vegetal necrosado y callos, se sembraron 10 por frasco. Todas las vitroplantas fueron colocados en el cuarto de crecimiento con las condiciones ambientales mencionadas en la etapa de elongación. Se repitió el proceso de obtención de explantes del segundo subcultivo hasta llegar al cuarto subcultivo y cada uno tuvo una duración de 5 semanas, teniendo en cuenta que la primera semana fue la de adaptación. En cada subcultivo, semanalmente se muestreo aleatoriamente para realizar la cuantificación de polifenoles totales. Cada proceso y muestro fue realizado por triplicado. Los tratamientos ejecutados se detallan en la tabla 1.

Figura 2. Cortes en las vitroplantas para los procesos de subcultivo. **A)** Corte en la base de la yema axilar para obtener el explante para el primer subcultivo. **B)** corte en base del explante para quitar tejido vegetal necrosado y callos, y otro corte transversal en la mitad de la planta para tener explantes iniciales de 4cm, para posteriores cultivos.

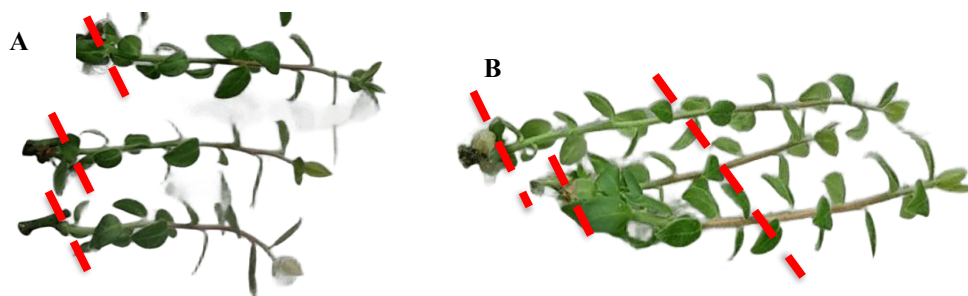


Tabla 1. Tratamientos establecidos para la extracción de polifenoles por subcultivos.

Tratamiento	Codificación	Significado
1	T1	Subcultivo 1 semana 0
2	T2	Subcultivo 1 semana 1
3	T3	Subcultivo 1 semana 2
4	T4	Subcultivo 1 semana 3
5	T5	Subcultivo 1 semana 4
6	T6	Subcultivo 2 semana 0
7	T7	Subcultivo 2 semana 1
8	T8	Subcultivo 2 semana 2
9	T9	Subcultivo 2 semana 3
10	T10	Subcultivo 2 semana 4
11	T11	Subcultivo 3 semana 0
12	T12	Subcultivo 3 semana 1
13	T13	Subcultivo 3 semana 2
14	T14	Subcultivo 3 semana 3
15	T15	Subcultivo 3 semana 4
16	T16	Subcultivo 4 semana 0
17	T17	Subcultivo 4 semana 1
18	T18	Subcultivo 4 semana 2
19	T19	Subcultivo 4 semana 3
20	T20	Subcultivo 4 semana 4

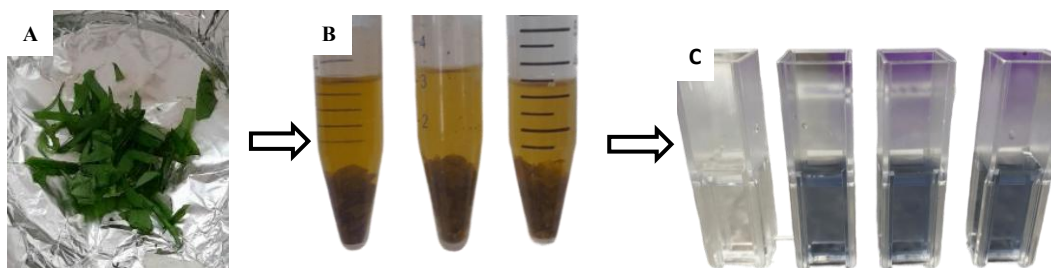
3.2.3 Extracción y cuantificación de Polifenoles

La extracción de los polifenoles se basó en los protocolos de Ehlenfeldt, M. K., & Prior, R. L. (2001) y de Andrade M. (2024). Se pesaron 0.2g de vitroplantas

tomadas completamente al azar de un frasco, se cortaron en trozos finos tanto hojas como tallos y callos (Fig. 3A). Se maceró con 4mL de una solución acuosa al 49.5% de acetona y 0.05% de ácido acético glacial (Fig. 3B). Las muestras se llevaron a agitación a 150rpm por 24h a temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$). Posteriormente se centrifugó a 5000rpm en una centrifuga Refrigerada Thermo scientific HERAUS por 15min para suspender los polifenoles totales.

Para la cuantificación de la concentración de polifenoles totales se usó el método del Folin-Ciocalteu de Andrade M. (2024). Se tomaron 0.5mL del sobrenadante y se colocó en un vial ámbar de 10mL, se añadió 0.75mL de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar por 8min. Se agregó 0.75mL de carbonato de sodio al 20% y se dejó reposar 60min (Fig. 3C). Las muestras se leyeron a una longitud de 760nm usando como blanco los solventes de extracción y de revelación (Pavlović et al., 2013). La concentración de polifenoles totales fue expresada en miligramos equivalentes de ácido gálico por cada gramo de peso seco (mgAGE/gPS). Se usó una solución patrón de 100mg/L de ácido gálico, para generar la curva de calibración con concentraciones de 2 a 6.5mg/L.

Figura 3. Metodología de extracción y cuantificación de polifenoles. **A)** hojas y tallos finamente cortados, **B)** muestras maceradas y centrifugas con los solventes de extracción previo a la revelación, **C)** revelación de polifenoles totales mediante el método del Folin-Ciocalteu.



3.3 Ejecución del segundo objetivo

3.3.1 Producción de Polifenoles mediante estrés lumínico

Habiendo establecido la mejor semana dentro de los subcultivos para producción de polifenoles, se procedió a elicitar con diferentes espectros de luz LED en dicha semana. Las cámaras de elicitación fueron de 45cm de alto, 37.5cm de ancho y 40cm de profundidad (Fig. 4). Basado en los protocolos de Hung et al., (2016); Hashim. (2021) y Zhang. (2022); Andrade, (2024), se colocaron como tratamientos la luz azul (380-500nm) a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $54.72\mu\text{mol}/\text{m}^2\times\text{s}$, la luz roja (660nm) a $48.83\mu\text{mol}/\text{m}^2\times\text{s}$, y la luz blanca (380-750nm) a $58.75\mu\text{mol}/\text{m}^2\times\text{s}$. Se aplicaron periodos de estrés lumínico de: 72h, 96h y 120h (Tabla 2) en los que se midió la concentración de polifenoles totales siguiendo el protocolo de extracción y cuantificación de polifenoles detallado anteriormente. La intensidad de luz se midió con un Luxómetro LIGHT METER LICOR 250^a.

La unidad del contenido de polifenoles totales se expresó en miligramos equivalentes de ácido gálico por cada gramo de peso seco de vitroplantas de *V. corymbosum* (mgAGE/gPS). Para obtener el peso seco y el porcentaje de humedad de las muestras vegetales en cada tratamiento se utilizó un analizador de humedad RADWAG BALANCES & SCALES (Pavlović et al., 2013).

Figura 4.

Cámaras elicitación lumínica para la producción de polifenoles.



Tabla 2. *Tratamientos establecidos para la elicitación por estrés lumínico.*

Tratamiento	Codificación	Significado
1	BT1	Luz blanca a 72h
2	BT2	Luz blanca a 96h
3	BT3	Luz blanca a 120h
4	AT1	Luz azul a 72h
5	AT2	Luz azul a 96h
6	AT3	Luz azul a 120h
7	RT1	Luz roja a 72h
8	RT2	Luz roja a 96h
9	RT3	Luz roja a 120h

3.4

En el presente trabajo de investigación las diferencias estadísticas de los datos de cada objetivo se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con una prueba posterior de Tukey. Las diferencias significativas se determinaron utilizando un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$). Se usó 3 réplicas en todos los experimentos y mediciones. Además, se midió la unidad de polifenoles totales con equivalentes de ácido gálico según el peso seco (Guo, Y. 2019).

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos sobre la producción de polifenoles en vitroplantas de *V. corymbosum* expuestas a diferentes inductores como los subcultivos y estrés lumínico.

4.1. Actividad preliminar: Elongación

La etapa de elongación generó un crecimiento aproximado de 3cm obteniendo vitroplantas con un promedio general de 6cm de longitud en 30 días. Estos resultados concuerdan con la tendencia de crecimiento que presenta el trabajo de Rodríguez Beraud, M., & Morales Ulloa, D. (2015), quienes iniciaron el proceso de elongación

con tallos de 1.5cm de *V. corymbosum* variedad Legacy y finalmente obtuvieron tallos de 3.2cm como promedio general después de 45 días. Duplicando su altura inicial al concluir el ensayo. Sin embargo, la presente investigación muestra una mayor elongación en un tiempo menor, ya que la longitud del tallo se duplica a los 30 días a diferencia de la investigación de Rodríguez Beraud, M., & Morales Ulloa, D. (2015) que requiere 15 días más para obtener dicha tendencia en sus resultados. Probablemente la diferencia de longitud entre los trabajos se deba a la densidad de brotes por frasco, ya que Rodríguez Beraud, M., & Morales Ulloa, D. (2015) colocaron 20 brotes por cada frasco a diferencia del presente trabajo donde se colocó 5 brotes por frasco.

El presente trabajo presentó tallos con mayor elongación usando el regulador de crecimiento 2i-P a comparación de las investigaciones de Casahualpa, P. (2024) quien obtuvo tallos con una altura de 3.8cm a los 30 días y de Cueva y Granja. (2024) que obtuvieron tallos de 3.2cm de altura después de 60 días. Estas diferencias pueden deberse a que en la presente investigación se usó el medio comercial Woody Plant suplementado con vitaminas a diferencia de la ausencia de estas en el trabajo de Casahualpa, P. (2024). Mientras que las diferencias de altura de las vitroplantas con el trabajo de Cueva y Granja. (2024) pudo deberse a la concentración del regulador de crecimiento 2i-P, el trabajo actual aplicó una concentración de 2.5mg/L para el proceso de elongación a diferencia de Cueva y Granja. (2024) que usaron 2 mg/L del fitoregulador de crecimiento 2i-P

4.2. Producción de polifenoles totales de acuerdo con el subcultivo

La curva de calibración en base al ácido gálico generó una ecuación de la recta

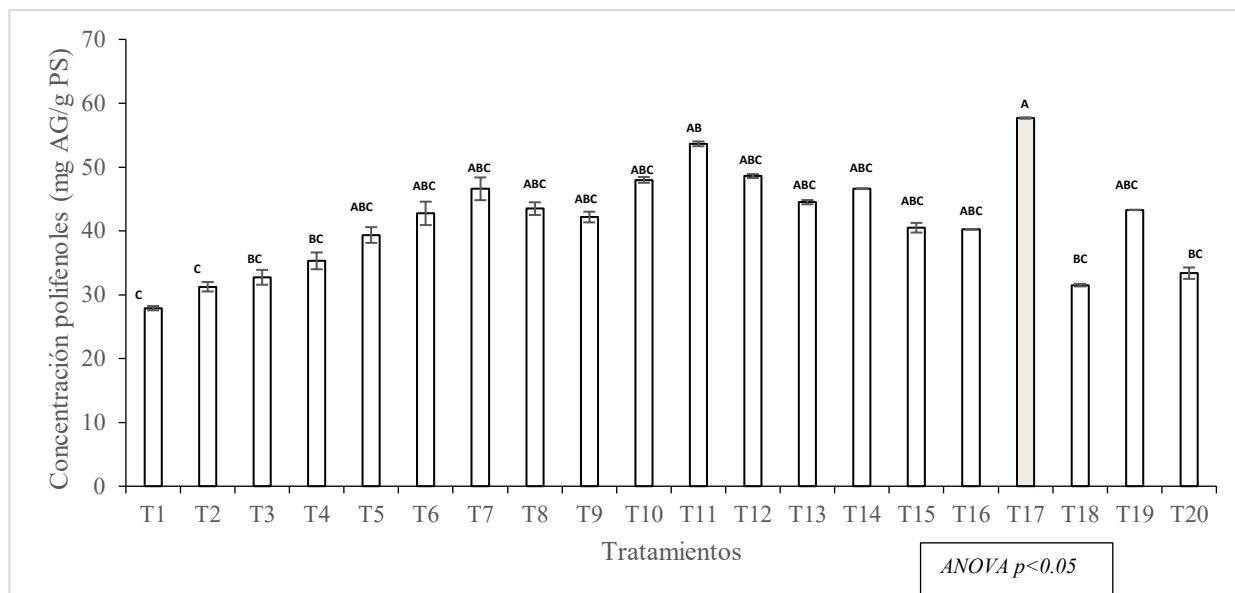
$$y = 0.174x - 0.102 \qquad \text{Ecuación 1}$$

donde Y corresponde a la absorbancia y X a la concentración del ácido gálico. La curva presentó un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.980$ (Anexo 1).

La prueba de ANOVA mostró que hay diferencias significativas entre la interacción de las semanas y los subcultivos ($F = 3.14$; $p < 0.05$), indicando que el tiempo en semanas dentro de cada subcultivo afecta directamente la concentración de polifenoles totales en cada tratamiento (Anexo 2).

Las medias muestran que el tratamiento con mayor concentración de polifenoles totales es el T17 (Subcultivo 4 en la semana 1) con $57.69 \text{ mg AGE/g PS}$ (Fig. 5). La presente investigación tuvo una mayor concentración de polifenoles totales a comparación con las obtenidas por Ștefănescu. (2020) en extractos de hojas *in situ* de *V. corymbosum* ($0.1355 \text{ mg AGE/g PS}$). Estos resultados pueden deberse a que las muestras del trabajo actual fueron tomadas después de un proceso de elicitación por subcultivos *in vitro*. Otro motivo para el aumento de los polifenoles en el presente trabajo pudo deberse a que fueron expuestas a un fotoperiodo con mayores horas de Luz (18h) a diferencia de Ștefănescu. (2020) que trabajo con la luz del ambiente de 12h.

Figura 5. Concentración de los polifenoles totales, según la interacción del tiempo y los subcultivos. La barra de color gris representa la media con la concentración más alta de polifenoles en cuanto a los tratamientos.



Por otro lado, el presente trabajo presenta una concentración más alta de polifenoles totales al compararse con otras investigaciones realizadas *in vitro* como el trabajo de Contreras et al., (2015) con 40mgAGE/gPS y Andrade. (2024) con 51.24mgAGE/gPS. Estas diferencias en la concentración de polifenoles totales pueden deberse a la edad que presentan las vitroplantas al ser muestreadas, la investigación actual muestreo en la semana 1 del subcultivo 4 a diferencia de Contreras et al., (2015) que realizaron el muestro en la semana 4 del subcultivo 1 y Andrade. (2024) cuantifico los polifenoles en la semana 1 del subcultivo 1.

4.3. Producción de polifenoles totales por elicitación lumínica

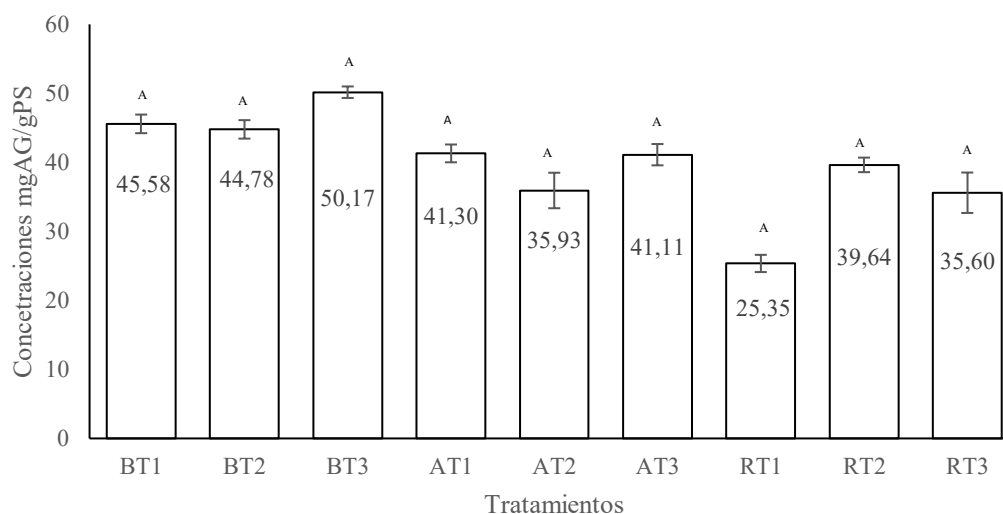
Después de exponer a un estrés lumínico a las vitroplantas del subcultivo 4 en la semana 1, estadísticamente el ANOVA mostro que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($F=1.78$; $p>0.05$), indicando que la relación del tiempo de exposición y longitud de onda no afectan directamente la concentración de polifenoles totales en

cada tratamiento (Anexo 4). Constatándose, con el análisis de la prueba de Tukey (Anexo 5) que indica que todos los tratamientos pertenecen al mismo grupo.

La media con la concentración más alta de polifenoles totales fue el control C3 (luz Blanca a las 120h) con una concentración de 50.17mgAGE/gPS a comparación de los tratamientos de luz azul y roja (Fig. 6). Este resultado puede deberse a la coloración rojiza que presentaban las vitroplantas en la luz LED blanca a diferencia de las vitroplantas en las otras longitudes de onda. Esto se refuerza con lo mencionado por Routray et al., (2018) que dice que la coloración de las hojas se relaciona con la concentración de compuestos fenólicos, ya que en sus resultados las vitroplantas con tonalidades rojizas tuvieron concentraciones más altas de polifenoles totales, en este caso el tratamiento con luz LED azul presento estas características colorimétricas.

En el trabajo actual la concentración de polifenoles totales obtenida por la elicitación lumínica fue menor a la obtenida en la elicitación por subcultivos. Esto puede deberse a que en el periodo de elicitación el país atravesó cortes energéticos, que provocó una reducción aleatoria de 6-20h en los tiempos de exposición en las diferentes longitudes de onda. Como se menciona en los trabajos de Long et al., (2024) y Wu et al., (2022) Orozco, M. (2024). la disminución drástica de luz, ya sea una exposición prolongada a niveles altos de sombra o una sombra súbita disminuye significativamente en contenido de compuestos fenólicos, reducción en la expresión de enzimas como CHS y ANS que participan en la ruta de la biosíntesis de las flavonas y antocianinas.

Figura 6. Concentración de los polifenoles totales, según el tiempo de elicitación lumínica.



A pesar de que el presente estudio continúa la investigación realizada por Andrade. (2024), discrepa de la longitud de onda que mostró una mayor concentración de polifenoles totales. En el trabajo actual, el tratamiento con la longitud de onda blanca a las 120h presento una mayor concentración de polifenoles totales a diferencia del trabajo de Andrade, M. (2024), donde la mayor concentración de polifenoles totales se logró al exponer las vitroplantas a una longitud de onda azul por 72h, alcanzando 61.01mgAGE/gPS. El presente trabajo arrojó una menor concentración de polifenoles totales obtenida por Andrade, M. (2024) con 10 unidades menos. Estos resultados pueden aludirse a los cortes aleatorios de luz que atravesó el país cuando se realizó los ensayos de elicitación lumínica.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El subcultivo 4 en la semana 1 generó la concentración más alta de polifenoles totales con 57.69mgAGE/gPS respecto al subcultivo 1 semana 1 con 27.9mgAGE/gPS.
- La exposición de las vitroplantas de *V. corymbosum* a la luz LED blanca por 72h genera concentraciones de polifenoles totales de 50.17mgAGE/gPS, siendo mayor a la de los tratamientos con luz roja y azul.
- La elicitación por subcultivos resultó ser el método que generó una mayor concentración de polifenoles totales con 57.69mgAGE/gPS respecto al estrés con luz LED que tuvo 7 unidades menos.

5.2. Recomendaciones

- Realizar un quinto subcultivo para asegurar la viabilidad de la producción de los polifenoles totales después del cuarto subcultivo.
- Cultivar las vitroplantas en un medio líquido como el sistema de inmersión temporal para evaluar su efecto en la producción de polifenoles totales.
- Usar medios con vitaminas para las etapas de subcultivo y estrés lumínico, y evaluar cómo afecta en la producción de polifenoles.
- Implementar la elicitación por luz LED en el subcultivo 3 en la semana de adaptación la cual también presento una alta concentración de polifenoles totales y comparar si hay el mismo resultado que el que se obtuvo en el subcultivo 4 semana 1.

REFERENCIAS

- Aldaz, J. C., Andreu-Coll, L., Font, R. M., & García, F. H. (2024). The Mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*): a review of its suitability as a promissory crop in the Ecuadorian Paramo and its potential uses, environmental role, and health benefits. *European Food Research and Technology*, 250(8), 2103–2109. <https://doi.org/10.1007/s00217-024-04546-4>
- Andrade, M. (2024). Evaluación de diferentes longitudes de onda de luz para producción de antocianinas en explanes de *Vaccinium corymbosum*. Ibarra, Imbabura [Tesis de grado]. Universidad Técnica del Norte.
- Bertelli, A., Biagi, M., Corsini, M., Bains, G., Cappellucci, G., & Miraldi, E. (2021). Polyphenols: From theory to practice. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(11), 2595. <https://doi.org/10.3390/foods10112595>
- Casahualpa, P. (2024). Establecimiento de un protocolo de micropropagación de arándano (*Vaccinium corymbosum*) variedad Biloxi en Ibarra, Imbabura [Tesis de grado]. Universidad Técnica del Norte.
- Caranqui-Aldaz, J. M., Muelas-Domingo, R., Hernández, F., & Martínez, R. (2022). Chemical composition and polyphenol compounds of *Vaccinium floribundum Kunth* (ericaceae) from the volcano Chimborazo Paramo (Ecuador). *Horticulturae*, 8(10), 956. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100956>
- Clapa, D., Nemeş, S.-A., Ranga, F., Hârţa, M., Vodnar, D.-C., & Călinoiu, L.-F. (2022). Micropropagation of *Vaccinium corymbosum* L.: An alternative procedure to

produce secondary metabolites. *Horticulture*, 8(6), 480.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae8060480>

Contreras, R. A., Köhler, H., Pizarro, M., & Zúiga, G. E. (2015). In Vitro Cultivars of *Vaccinium corymbosum* L. (Ericaceae) are a Source of Antioxidant Phenolics. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 4(2), 281–292.
<https://doi.org/10.3390/antiox4020281>

Cueva y Granja. (2024). *Protocolo para la propagación in vitro de arándano (Vaccinium corymbosum L.) cv. Biloxi*. [Tesis de grado]. Universidad de Loja.
<https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/28750>

Czernicka, M., Sowa-Borowiec, P., Puchalski, C., & Czerniakowski, Z. W. (2024). Content of bioactive compounds in highbush blueberry *Vaccinium corymbosum* L. leaves as a potential raw material for food technology or pharmaceutical industry. *Foods (Basel, Switzerland)*, 13(2), 246.
<https://doi.org/10.3390/foods13020246>

Debnath-Canning, M., Unruh, S., Vyas, P., Daneshtalab, N., Igamberdiev, A. U., & Weber, J. T. (2020). Fruits and leaves from wild blueberry plants contain diverse polyphenols and decrease neuroinflammatory responses in microglia. *Journal of Functional Foods*, 68(103906), 103906.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103906>

Ehlenfeldt, M. K., & Prior, R. L. (2001). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2222–2227.
<https://doi.org/10.1021/jf0013656>

- Felgus-Lavefve, L., Howard, L., Adams, S. H., & Baum, J. I. (2022). The effects of blueberry phytochemicals on cell models of inflammation and oxidative stress. *Advances in Nutrition* (Bethesda, Md.), 13(4), 1279–1309. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab137>
- 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>
- Han, T., & Miao, G. (2024). Strategies, achievements, and potential challenges of plant and microbial chassis in the biosynthesis of plant secondary metabolites. *Molecules* (Basel, Switzerland), 29(9), 2106. <https://doi.org/10.3390/molecules29092106>
- Hashim, M., Ahmad, B., Drouet, S., Hano, C., Abbasi, B. H., & Anjum, S. (2021). Comparative effects of different light sources on the production of key secondary metabolites in plants in vitro cultures. *Plants*, 10(8), 1521. <https://doi.org/10.3390/plants10081521>
- Hogewoning, S. W., Trouwborst, G., Maljaars, H., Poorter, H., van Ieperen, W., & Harbinson, J. (2010). Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light. *Journal of Experimental Botany*, 61(11), 3107–3117. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq132>
- Hung, C. D., Hong, C., Kim, S., Lee, K., Park, J., Nam, M., Choi, D. G., & Lee, H. (2016). LED light for in vitro and ex vitro efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(6). <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2164-0>

- Karppinen, K., Zoratti, L., Nguyenquynh, N., Häggman, H., & Jaakola, L. (2016). On the developmental and environmental regulation of secondary metabolism in *Vaccinium* spp. Berries. *Frontiers in Plant Science*, 7, 655. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00655>
- Long, J., Tan, T., Zhu, Y., An, X., Zhang, X., & Wang, D. (2024). Response of blueberry photosynthetic physiology to light intensity during different stages of fruit development. *PloS One*, 19(9), e0310252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0310252>
- Mengist, M. F., Grace, M. H., Xiong, J., Kay, C. D., Bassil, N., Hummer, K., Ferruzzi, M. G., Lila, M. A., & Iorizzo, M. (2020). Diversity in metabolites and fruit quality traits in blueberry enables ploidy and species differentiation and establishes a strategy for future genetic studies. *Frontiers in plant science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00370>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Feo, V., Pimentel, T. C., Coppola, R., & Cruz, A. G. (2022). Polyphenols applications in food industry sector. En *Technologies to Recover Polyphenols from AgroFood By-products and Wastes* (pp. 301–336). Elsevier.
- Onuh, J. O., Dawkins, N. L., & Aluko, R. E. (2023). Cardiovascular disease protective properties of blueberry polyphenols (*Vaccinium corymbosum*): a concise review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s43014-023-00139-y>
- Orozco, M. (2024). 2024: *El año en que se fue y regresó la luz*. Primicias. <https://www.primicias.ec/economia/crisis-electricidad-cortes-luz-resumen2024-86508/>

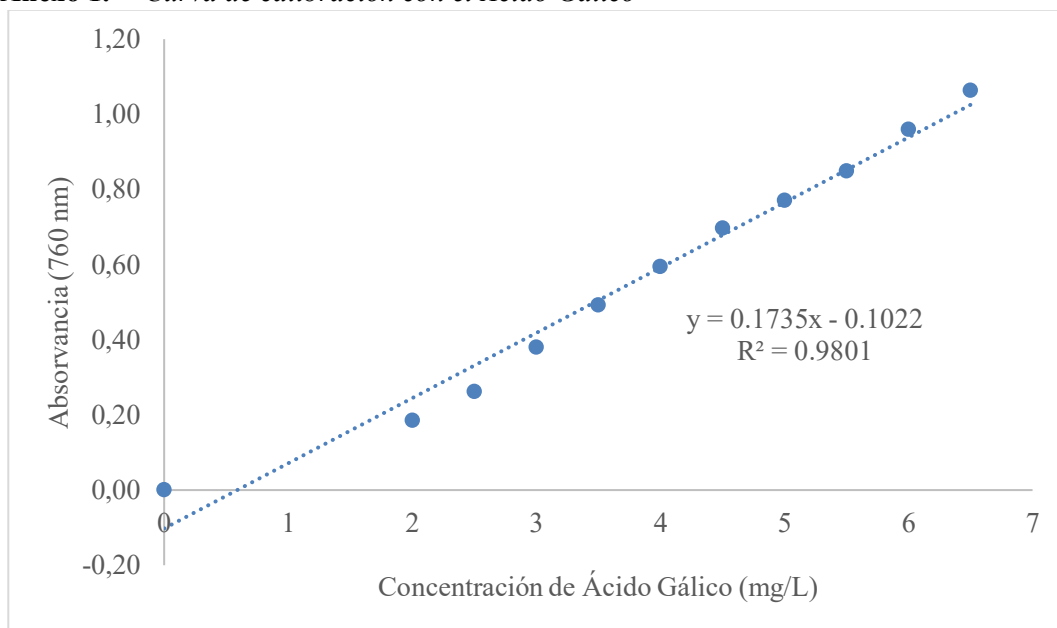
- Pavlović, A. V., Dabić, D. Č., Momirović, N. M., Dojčinović, B. P., Milojković Opsenica, D. M., Tešić, Ž. Lj., & Natić, M. M. (2013). Chemical Composition of Two Different Extracts of Berries Harvested in Serbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17), 4188-4194. <https://doi.org/10.1021/jf400607f>
- Peng, H., Pang, Y., Liao, Q., Wang, F., & Qian, C. (2022). The effect of preharvest UV light irradiation on berries quality: A review. *Horticulturae*, 8(12), 1171. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8121171>
- Rana, A., Samtiya, M., Dhewa, T., Mishra, V., & Aluko, R. E. (2022). Health benefits of polyphenols: A concise review. *Journal of Food Biochemistry*, 46(10), e14264. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14264>
- Rodríguez Beraud, M., & Morales Ulloa, D. (2015). Effect of explant density and volume of cultivation medium on in-vitro multiplication of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) varieties “Brigitta” and “Legacy”. *Scientia agropecuaria*, 6(1), 31–40. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.03>
- Routray, W., Orsat, V., & Lefsrud, M. (2018). Effect of postharvest LED application on phenol and antioxidant components of blueberry leaves. *ChemEngineering*, 2(4), 56. <https://doi.org/10.3390/chemengineering2040056>
- Samkumar, A., Jones, D., Karppinen, K., Dare, A. P., Sipari, N., Espley, R. V., Martinussen, I., & Jaakola, L. (2021). Red and blue light treatments of ripening bilberry fruits reveal differences in signalling through abscisic acid-regulated anthocyanin biosynthesis. *Plant, Cell & Environment*, 44(10), 3227–3245. <https://doi.org/10.1111/pce.14158>

- Sedlák, J., & Paprštejn, F. (2009). In vitro multiplication of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *Acta horticulturae*, 810, 575-580. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2009.810.76>
- Ștefănescu, B.-E., Călinoiu, L. F., Ranga, F., Fetea, F., Mocan, A., Vodnar, D. C., & Crișan, G. (2020). The chemical and biological profiles of leaves from commercial blueberry varieties. *Plants*, 9(9), 1193. <https://doi.org/10.3390/plants9091193>
- Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review. *ISRN Biochemistry*, 2013, 762412. <https://doi.org/10.1155/2013/762412>
- Wei, Z., Yang, H., Shi, J., Duan, Y., Wu, W., Lyu, L., & Li, W. (2023). Effects of different light wavelengths on fruit quality and gene expression of anthocyanin biosynthesis in blueberry (*Vaccinium corymbosum*). *Cells (Basel, Switzerland)*, 12(9), 1225. <https://doi.org/10.3390/cells12091225>
- Wu, Y., Huang, Z., Zhang, C., Shi, C., Lyu, L., Li, W., & Wu, W. (2022). Comparative analysis of the morphological, physiological, proteomic, and metabolic mechanisms of the “Biloxi” blueberry response to shade stress. *Frontiers in Plant Science*, 13, 877789. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.877789>
- Yang, S., Wang, C., Li, X., Wu, C., Liu, C., Xue, Z., & Kou, X. (2021). Investigation on the biological activity of anthocyanins and polyphenols in blueberry. *Journal of Food Science*, 86(2), 614–627. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15598>

Zhang, D., Liu, Y., Ni, C., & Chen, J. (2022). Effect of LED light on the growth and physiological indices of blueberry. *Agronomy Journal*, 114(4), 2105-2112.
<https://doi.org/10.1002/agj2.21043>

ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración con el Ácido Gálico



Anexo 2. Análisis de varianza de la cuantificación de polifenoles totales en los subcultivos

F.V.	SC	gl	CM	F	p	
Modelo	3829.13	21	182.34	4.67	<0.0001	
Siembra	1568.85	3	522.95	13.38	<0.0001	**
Semana	408.95	4	102.25	2.62	0.0502	
Tratamientos	1474.32	12	122.86	3,14	0.0035	**
Bloques	377.01	2	188.51	4.82	0.0136	**
Error	1484.88	38	39.08			
Total	5314.02	59				

Nota: F.V: Fuentes de Variación, SC: Sumatoria de cuadrados, gl: Grados de libertad, CM= Cuadrados medios, F: proporción de la varianza y p: valor de probabilidad, **: significancia estadística

Anexo 3. Resultados de la prueba de Tukey al 5% de los tratamientos utilizados en la extracción y cuantificación de polifenoles totales.

Tratamientos	Medias (mgAG/gPS)	n	E.E			
T17	57.69	3	3.94	A		
T11	53.64	3	3.94	A	B	
T12	48.6	3	3.94	A	B	C
T10	47.99	3	3.94	A	B	C
T14	46.62	3	3.94	A	B	C
T7	46.6	3	3.94	A	B	C
T13	44.5	3	3.94	A	B	C
T8	43.49	3	3.94	A	B	C

T19	43.3	3	3.94	A	B	C
T6	42.75	3	3.94	A	B	C
T9	42.18	3	3.94	A	B	C
T15	40.5	3	3.94	A	B	C
T16	40.24	3	3.94	A	B	C
T5	39.36	3	3.94	A	B	C
T4	35.31	3	3.94		B	C
T20	33.38	3	3.94		B	C
T3	32.73	3	3.94		B	C
T18	31.51	3	3.94		B	C
T2	31.25	3	3.94			C
T1	27.9	3	3.94			C

Anexo 4. *Análisis de la varianza de la cuantificación de polifenoles totales en la elicitación lumínica.*

F.V.	SC	gl	CM	F	p
Modelo	1332.97	11	121.18	1.78	0.1140
Tratamientos	1332.97	11	121.18	1.78	0.1140
Error	1629.81	24	67.91		
Total	2962.78	35			

Anexo 5. *Resultados de la prueba de Tukey al 5% de los tratamientos utilizados en la extracción y cuantificación de polifenoles totales.*

Tratamientos	Medias (mgAG/gPS)	n	E.E.	
BT3	50.17	3	4.95	A
BT1	45.58	3	4.95	A
BT2	44.78	3	4.95	A
AT1	41.30	3	4.95	A
AT3	41.11	3	4.95	A
AT2	39.64	3	4.95	A
AT2	35.93	3	4.95	A
RT3	35.60	3	4.95	A
RT1	25.35	3	4.95	A