



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

MICROPROPAGACIÓN DE PLÁNTULAS DE MORTIÑO  
(*Vaccinium floribundum Kunth*) BAJO CONDICIONES *IN VITRO*.

Autora

Lisbeth Geovana Recto Román

Año  
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

MICROPROPAGACIÓN DE PLÁNTULAS DE MORTIÑO (*Vaccinium  
floribundum* Kunth) BAJO CONDICIONES *IN VITRO*.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos

Profesora Guía

Ph.D. Luis Eduardo Morillo Velasteguí

Autora

Lisbeth Geovana Recto Román

Año

2018

### **DECLARACIÓN PROFESOR GUÍA**

“Declaro haber dirigido el trabajo, Micropropagación de plántulas de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) bajo condiciones *in vitro*, a través de reuniones periódicas con el estudiante Lisbeth Geovana Recto Román, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Luis Eduardo Morillo Velasteguí

Doctor Recursos Fitogenéticos e Interacciones Biológicas

C.I. 1708207632

### **DECLARACIÓN PROFESOR CORRECTOR**

"Declaro haber revisado este trabajo, Micropropagación de plántulas de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) bajo condiciones *in vitro*, del Lisbeth Geovana Recto Román, en el semestre 2018-2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Pablo Santiago Moncayo Moncayo

Magíster en Dirección de Operaciones y seguridad Industrial

C.I. 1712367505

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

---

Lisbeth Geovana Recto Román

C.I. 2100429949

## **AGRADECIMIENTO**

Gracias a Dios por tener la bendición de compartir esta aventura junto a mi familia, gracias por apoyarme y empujarme siempre a ir tras mis sueños. Gracias a David por ser mi apoyo durante los momentos tristes y por acompañarme a disfrutar de los momentos de mayor alegría en mi vida, gracias también, a mis amigas del alma Gina, Alejandra, Gisela, Paola y Erika quienes han sido han sido parte fundamental en este proceso.

## **DEDICATORIA**

Mi tesis se la dedico a mis padres Jorge y Targelia, por su sacrificio, por toda su confianza y por siempre darme alas para volar tan alto como mis sueños lo merecieran. A mis amados hermanos Alex y Amparito quienes me apoyaron y me dieron el coraje para continuar batallando. Finalmente, a mi sobrina Camila, quien se ha convertido en la alegría del hogar.

## RESUMEN

En este trabajo se evaluó la micropropagación de plantas bajo condiciones *in vitro*, con la interacción entre: reguladores de crecimiento (zeatina y 2 ip), dosis (alta y baja) y condiciones ambientales de desarrollo con el factor fotoperiodo (16H y 0 H luz). El proyecto se dividió en dos fases denominadas subcultivos, con un periodo de 60 días de estudio para cada uno. En el primer subcultivo se dispusieron 10 plantas para cada tratamiento, las cuales fueron sembradas individualmente en un tubo de ensayo que contenía el medio con la hormona y dosis en estudio, al transcurrir el periodo de estudio se obtuvieron un promedio de 2.98 plantas por cada planta sembrada inicialmente. Para el segundo subcultivo se utilizaron las plántulas provenientes del primer ciclo, las cuales al igual que en la primera fase fueron sembradas individualmente en un tubo de ensayo, obteniendo un promedio de 3.97 plantas viables. Se realizó un diseño de bloques completamente al azar con dos observaciones por cada tratamiento. En el primer subcultivo el mejor tratamiento para las variables: número de brote, coeficiente de variación y longitud de brotes fue el 3, el cual corresponde a zeatina en dosis baja (0.5 ppm) y con 16 horas luz. Para el segundo subcultivo se obtuvo similitud en la tendencia de resultados, donde al igual que en la primera fase de investigación el tratamiento 3 resultó ser el mejor para multiplicación, sin embargo, existieron variaciones en cuanto a longitud de brote, resultando el tratamiento 1 que estuvo formado por zeatina en dosis alta con un fotoperiodo de 16 horas luz como el mejor.

**Palabras clave:** Micropropagación, brotes, reguladores de crecimiento, dosis condiciones ambientales, subcultivo.

## ABSTRACT

In this work the micropropagation of plants under in vitro conditions was evaluated, with the interaction between growth regulators (zeatin and 2 ip), dose (high and low) and in two environmental conditions of development with the photoperiod factor (16H and 0 H. light). The project was divided into two phases called subcultures, with a period of 60 days of study for each. In the first subculture, 10 plants were arranged for each treatment, which were individually planted in a test tube containing the medium with the last and the dose under study. At the end of the study period, an average of 2.98 plants were obtained for each plant. For the second subculture, seedlings from the first cycle were used, which, as in the first phase, were planted individually in a test tube, obtaining an average of 3.97 viable plants. A completely randomized block design was made with two observations for each treatment. In the first subculture, the best treatment for the variables: number of shoot, coefficient of variation and length of shoots was 3, which corresponds to zeatin in low dose (0.5 ppm) and 16 light hours. For the second subculture, similarity was obtained in the trend of results, where, as in the first research phase, treatment 3 turned out to be the best for multiplication, however, there were variations in the length of the outbreak, resulting in treatment 1 that It was formed by zeatin in high dose with a photoperiod of 16 light hours as the best.

**Key words:** Micropropagation, buds, growth regulators, dose environmental conditions, subculture.

# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	OBJETIVOS.....	3
1.1.1	Objetivo General.....	3
1.1.2	Objetivos Específicos .....	3
1.2	HIPOTESIS.....	3
2.	CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1	Origen.....	4
2.2	Fenología.....	5
2.3	Utilización .....	6
2.4	Importancia del mortiño.....	6
2.5	Conservación de la ecología de los páramos.....	8
2.6	Agrotecnología .....	8
2.7	Biotecnología.....	8
2.8	Cultivo in vitro.....	9
2.8.1	Cultivo de tejidos .....	9
2.8.2	Ventajas y desventajas de cultivo in vitro .....	9
2.8.3	Fases de la micropropagación in vitro .....	10
2.8.4	Condiciones Ambientales .....	11
2.9	Medio de cultivo .....	12
2.9.1	Composición de los medios de cultivo.....	12
2.9.2	Micropropagación in vitro en otros arándanos.....	14
2.9.3	Micropropagación Vaccinium floribundum Kunth.....	16
3.	MARCO METODOLÓGICO.....	17
3.1	Materiales.....	17
3.2	Características del sitio experimental.....	18
3.2.1	Ubicación.....	18
3.2.2	Características del lugar experimental.....	19
3.3	Características del laboratorio.....	19
3.4	Metodología.....	20

3.4.1	Multiplicación in vitro.....	20
3.4.2	Primer subcultivo .....	20
3.4.3	Segundo Subcultivo.....	20
3.5	Factores en estudio.....	20
3.6	Variables.....	21
3.7	Unidad experimental.....	21
3.8	Tratamientos.....	22
3.9	Diseño experimental y análisis funcional.....	22
3.10	Esquema de análisis de la varianza.....	22
4.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	24
4.1	Primer subcultivo: Análisis de variables.....	24
4.1.1	Longitud de brote.....	24
4.1.2	Coeficiente de multiplicación .....	25
4.2	Segundo subcultivo: Análisis de variables.....	29
5.	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	33
5.1	Conclusiones.....	33
5.2	Recomendaciones.....	33
	<b>REFERENCIAS</b> .....	34
	<b>ANEXOS</b> .....	41

## 1. INTRODUCCIÓN

### **Antecedentes**

El mortiño es un frutal endémico de los Andes ecuatorianos, bolivianos y colombianos (Ruskin, 1989), pertenece a la familia de las Ericaceae (Sanjinés et al., 2006), la cual esta conformada por más de 4100 especies alrededor del mundo, de las cuales 900 se encuentran localizadas en América tropical, siendo *Vaccinium* spp., el género de mayor diversidad con 450 especies (Sanjinés et al., 2006)

Es un arbusto cuya altitud puede llegar hasta los 2.5 m, su fruto es un baya esférica, carnosa, pequeña (5-8 mm de diámetro) y de color negro, negro-azul o morado (Perez y Valdivieso, 2007). Crece a lo largo de la cordillera andina de manera silvestre, desde los 2500 hasta los 3300 msnm (Coba et al., 2012). Fructifica dos veces al año, la primera entre los meses de mayo y abril y la segunda, entre septiembre- diciembre (Perez y Valdivieso, 2007).

El contenido de componentes como antocianinas, celulosa, pectina y vitamina C le han conferido propiedades medicinales, ya que se ha descrito que estos nutrientes poseen propiedades antiulcerales, antitumorales y anticancerígenas (Riofrio, 2010). Además, el alto contenido de compuestos fenólicos, le otorgan una gran capacidad antioxidante (Vasco, 2009).

En Ecuador el empleo del fruto es en fresco, para la elaboración de la colada morada y procesado en harinas, jaleas, jugos, postres, vinos entre otros, en la industria textil se usa como colorante para tinturar lana, identificándose potencial agroindustrial (Chiluisa, 2015). Además, este fruto puede ser refrigerado sin que se altere su peso o volumen y sin que pierda sus características organolépticas y nutricionales, lo que permite tener un procesamiento eficiente en cualquier periodo del año (Coba et al., 2012).

Actividades como el sobrepastoreo, la deforestación, la quema repetitiva e incremento de la frontera agrícola han venido alterando la ecología natural en los páramos andinos provocando erosiones genéticas o pérdida de la diversidad de especies (Noboa, 2010) (Perez y Valdivieso, 2007). El mortiño al

ser un cultivo nativo de la cordillera andina, es una opción viable para la reforestación de los mismos, debido a, que su introducción no pondría en peligro la ecología natural de estos lugares (Noboa, 201; Perez y Valdivieso, 2007; Ruiz, 2011).

La producción de plantas puede realizarse a través de 1) forma sexual, es decir a partir de semillas botánicas, que es un proceso lento y difícil debido al bajo porcentaje de germinación de las mismas (Novoa 2010), y 2) reproducción asexual a través de a) estacas, que presentan inconvenientes ya que en diversos estudios realizados se ha reportado la falta de enraizamiento en las plántulas (Noboa, 2010), y b) cultivo *in vitro*, este método de propagación abarca una serie de técnicas (Castro y Álvarez, 2013), identificándose ventajas debido a la velocidad de multiplicación, calidad, y uniformidad del material vegetal, además se pueden obtener plantas en cualquier período del año ya que se desarrollan en laboratorios (Perugorria, 2012).

En el caso de mortiño se han realizado investigaciones previas, en las que se ha buscado métodos para su propagación, es el caso de Gonzales quien, en el año 2002, estudió la propagación de semillas, esquejes y estacas teniendo como resultados que para la primera variable se tuvo un porcentaje bajo de germinación, mientras que, para las dos últimas se tuvieron resultados negativos en el proceso de enraizamiento. Diana Trujillo, en el año 2008, experimentó con la micropropagación *in vitro*, usando hormonas como el ácido indolbutírico (IBA),  $\alpha$ -Naftalenacético (ANA), trans zeatina ribósido (TZR), Kinetina (KIN), 6-(gamma, gamma dimetilalilamino) purina (2ip), 6 -bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (NAA), ácido giberelético GA3, obteniendo como resultado que el único medio donde hubo brote, elongación y enraizamiento del explante fue con dosis alta de ANA pero, al final del ensayo, en la fase de transición *in vitro*-tierra se reportaron resultados negativos en todos los tratamientos.

Con estos antecedentes surgió la necesidad de plantear una investigación en la que se genere un procedimiento de micropropagación masiva utilizando herramientas biotecnológicas, para ello, ya se contaba con una fase previa,

realizada por Fernanda Dueña, quien el año 2017 generó un protocolo para la introducción de semillas y callos apicales, la fase posterior del proyecto se basó en la multiplicación de las plántulas generadas, utilizando reguladores de crecimiento y factores ambientales, los cuales permitieron realizar una evaluación e indicar cuál de los tratamientos usados presentó los mejores resultados.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo General**

- Estudiar la respuesta a la fase de multiplicación en medios semi sólidos de plántulas *in vitro* procedentes de semilla de mortiño.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Evaluar la capacidad de inducción para la formación de brotes de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) con dos hormonas a diferentes dosis.
- Determinar el fotoperiodo óptimo para la multiplicación de *in vitro* plantas de mortiño.

## **1.2 HIPOTESIS**

- **Hipótesis Nula:** Las herramientas biotecnológicas no responden eficientemente a la multiplicación *in vitro* del material vegetal de mortiño.
- **Hipótesis Alternativa:** Las herramientas biotecnológicas responden eficientemente a la multiplicación *in vitro* del material vegetal de mortiño.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Origen

El mortiño pertenece a la familia de las Ericaceae, formada por 126 géneros y aproximadamente 4100 especies de plantas alrededor del mundo, de las cuales un total de 66 géneros y más de 800 especies están ubicadas en los neotrópicos (Centroamérica y norte de Suramérica); El género *Vaccinium* es el más grande de esta familia formado por 450 especies, que en el caso de los neotrópicos son propias de regiones de altura o montaña (Luteyn & Pedraza, 2012). Las especies destacadas del género son: *V. myrtillus* llamado arándano o *blueberry* en Europa y el *V. macrocarpon* perteneciente a Norteamérica y conocido como *cranberry*. Existen, sin embargo, otras especies de interés como *V. corymbosum*, conocido como arándano alto o *highbush*, *V. ashei* llamado *rabbiteye* o arándano ojo de conejo, y *V. angustifolium* conocido como arándano bajo o *lowbush* (Abreu *et al.*, 2008).

En Sudamérica los principales productores de arándano son: Chile, Argentina, Uruguay y Perú (García *et al.*, 2013), en estos países la especie que predomina es la de arándano alto (*V. corymbosum*), para el caso de Chile las variedades más importantes son *Elliot*, *Bluecrop* y *O'Neal* (Pino, 2007), mientras que en Argentina son *O'Neal* y *Misty* (Kirschbaum y Rivadeneira, 2011), finalmente, en Perú, la variedad más usada es *biloxi* seguida de *Emerald* y *Misty* (Gargurevich, 2017). Por el contrario, en Colombia se ha encontrado potencial para la producción comercial de *V. meridionale* (Cámara de Comercio Hispano Colombiana, 2017), que es un arándano endémico del país, para ello la universidad Nacional de Colombia ha puesto en marcha su propagación tanto de forma sexual mediante semillas como asexual mediante ramas o estacas enraizadas (Agencia de Noticias UN, 2011), además, en cultivo *in vitro* han logrado obtener un porcentaje del 88-100% de plántulas viables luego de transcurrir el proceso de endurecimiento (Rache y Pacheco, 2012).

En Ecuador se ha reportado la presencia de tres especies del género *Vaccinium*: *V. distichum*, *V. crenatum* y *Vaccinium floribundum* Kunth (Perez y Valdivieso, 2007). *V. floribundum* Kunth, es originario del norte de Suramérica,

concretamente entre Colombia, Ecuador y Bolivia (Ruskin, 1989). En el país su propagación va desde el Carchi, en el páramo del Ángel hasta Cañar en Tambo (Perez y Valdivieso, 2007), desde los 2500 hasta los 3300 msnm (Coba *et al.*, 2012).

Tabla 1.

*Clasificación taxonómica del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Género	Vaccinium
Nombre Científico	Vaccinium floribundum kunth

Tomado de: Noboa, 2010

## 2.2 Fenología

### Floración

La especie *V. floribundum* presenta una alta floración por planta, sin embargo, tienden a presentarse una caída precoz de los frutos. La orientación de sus flores es en un mismo sentido, de manera que facilita la actividad de los polinizadores, aunque esta orientación cambia durante el desarrollo los pedúnculos (Chaparro y Becerra, 1999).

La floración se presenta dos veces por año, el primer ciclo se da de febrero a mayo y la segunda inicia de septiembre a diciembre (Pérez et al., 2007). La duración de la fase de floración a fructificación es mayor en plantas de origen sexual debido a una mayor desuniformidad entre ellas al inicio de la floración (Hernandez, 2010). El promedio de crecimiento en fase de floración es de 46 días (Dueñas, 2017). La floración se da en temporadas secas y se asocia inversamente con el brote de hojas (Gomez, 2004).

## **Fructificación**

Presenta dos temporadas de fructificación al año, la primera se da de abril a mayo, y la segunda, que es la cosecha más abundante, se da de septiembre a diciembre (Pérez et al., 2007).

El promedio de crecimiento en fase de fructificación es de 48 días. El total de días de crecimiento de la fase reproductiva del mortiño es de 150 (Dueñas , 2017).

### **2.3 Utilización**

Este cultivo no ha sido explotado con fines comerciales, sino que, únicamente se encuentra de forma silvestre en pequeñas parcelas a lo largo de los páramos andinos (Sanjinés *et al.*,2006). La producción del fruto presenta gran desventaja frente a otros arándanos principalmente por la falta de domesticación (Perez y Valdivieso, 2007). En Ecuador es conocido como: mortiño, blueberry de los Andes, uva de los Andes, uva de monte, manzanilla de cerro y raspadura de quemadura (Coba *et al.*, 2012). El consumo de este fruto está relacionado con un tema cultural debido a su uso en la elaboración de la tradicional colada morada. Además, es usado como materia prima para la elaboración de alimentos procesados como jaleas, mermeladas, galletas, jugos, helados, vinos, entre otros (Aguilar *et al.*, 2009;Coba et al., 2012).

### **2.4 Importancia del mortiño**

#### **Contenido nutricional**

Las especies de *Vaccinium* destacan por su potencial antioxidante debido contenido alto de compuestos polifenólicos como: ácido cinámico, antocianinas, antocianidinas y flavonoles. El contenido total de antocianinas es de 10 mg/ 100 g de fruta, mientras que el de fenoles es de 39 mg/ 100 g de fruta (Gaviria, *et al*, 2009). Además, se ha reportado la presencia de vitaminas como: la C y las del grupo B, minerales como: K, Ca, carbohidratos como: glucosa y fructosa y ácidos como: el cítrico y el málico, los cuales le confieren al fruto el sabor característico (Coba *et al.*, 2012).

### **Propiedades medicinales**

El mortiño es usado en caso de regulación intestinal y estreñimiento por su alto contenido de fibra; también, ayuda a fijar el calcio en los huesos e interviene en el funcionamiento óptimo del sistema nervioso por su contenido de minerales como fósforo y magnesio. Las hojas preparadas en infusión poseen características astringentes, diuréticas y tónicas por lo que son usadas para: disminuir los niveles de glucosa en la sangre, las contracciones del estómago e infecciones de la vejiga, el consumo de tres vasos diarios de dicha bebida reduce el riesgo de enfermedades cardíacas (Quingalomo, 2010; Perez y Valdivieso, 2007). El contenido de antioxidantes hace que prevenga o retrase la oxidación de otras moléculas, lo cual puede ser usado en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, también, se ha demostrado que el consumo de alimentos que contengan polifenoles y antocianinas reduce el riesgo de contraer enfermedades cardíacas y cáncer (Noboa, 2010). Los campesinos han utilizado el mortiño en caso de cólicos, fiebre, reumatismo, gripe, dolencias de órganos como: el hígado y los riñones (Perez y Valdivieso, 2007).

### **Usos agroindustriales**

Este fruto puede ser utilizado en la industria alimenticia como colorante y como materia prima para la elaboración de harinas, jaleas, mermelada, vinos, helados, salsas, bebidas calientes y frías, caramelos y enconfitados. A sabiendas de esto, comunidades se han asociado y formado empresas como Sumak Mickuy y Asociación de Productores de Vinos de Mortiño Quinticusí, ubicadas en Cotacachi y Cotopaxi respectivamente, para dedicarse al procesamiento de esta fruta, comercializándola deshidrata, en el caso de la primera y en vino en el caso de la segunda vendiendo hasta 400 botellas mensuales (Rodríguez, 2015) (Moreta, 2016). Otro uso en esta área es como aditivo alimentario (compuesto antioxidante), ya que estas sustancias retrasan el olor a rancio, reducen el riesgo de que aparezcan compuestos tóxicos, no permiten modificaciones en la textura y disminuyen el desgaste del valor

nutricional derivado de: la degradación de ácidos grasos esenciales y la pérdida de vitaminas como A, E y D (Quingalomo, 2010). Se usa para teñir telas en la industria textil (Roldán , 2012; Sanjinés *et al.*, 2006) El arbusto de mortiño es excelente para utilizarlo con fines ornamentales, debido a la forma y textura de sus hojas y por el tamaño que puede alcanzar con un adecuado manejo de podas (Armas , 2013).

Uno de sus parientes más cercanos, el agraz (*V. meridionale*) en Colombia ha tenido gran acogida en el mercado, donde empresas como Work y Crepes and Waffles se han interesado en la compra de esta fruta, por su parecido en sabor y por su valor que resulta ser económico en comparación con otras variedades de berries (Cámara de Comercio Hispano Colombiana, 2017).

## **2.5 Conservación de la ecología de los páramos**

Los páramos Andinos han sufrido cambios en su ecología debido a la deforestación, el sobrepastoreo, el incremento de la frontera agrícola y la quema repetitiva provocando la pérdida de la diversidad de especies. Esto ha despertado el interés por la reforestación, la cual se ha llevado a cabo con especies introducidas que han modificado la dinámica de los páramos y que, además, no ha resuelto las necesidades de protección y producción requeridas en la actualidad. El mortiño al ser una especie endémica de la zona podría ser usado como una alternativa para promover y mantener la biodiversidad de estas áreas contribuyendo a la protección de los suelos y las fuentes de agua (Noboa, 2010; Perez & Valdivieso, 2007).

## **2.6 Agrotecnología**

La agrotecnología hace referencia al conjunto de técnicas (recursos y procedimientos) usadas para contribuir en la solución de problemas agrícolas; Entre las técnicas que la constituyen están, las de hibridación, el cultivo *in vitro* de células y tejidos, el control biológico con microorganismos y la fermentación (Rocha, 2011).

## **2.7 Biotecnología**

Herramienta que usa organismos vivos o sus productos para crear o transformar un producto con fines prácticos; Esta técnica, se utiliza para solucionar problemas en todos los ámbitos de la elaboración y producción agrícola, incluyendo fitomejoramiento; Otro de sus usos es está en la producción de material de propagación libre de enfermedades y de bajo costo mediante el cultivo *in vitro* (Sharry *et al.*, 2015).

## **2.8 Cultivo in vitro**

### **2.8.1 Cultivo de tejidos**

Es la asociación de técnicas que mediante un explante (célula, tejido u órganos) que es sembrado en un medio de cultivo artificial con una composición química establecida y puesto bajo condiciones ambientales controladas genera plántulas de características fisiológicas, genéticas y morfológicas idénticas a las de la planta madre. Entre sus aplicaciones están: micropropagación a partir de una planta élite, propagación de plantas de condiciones agronómicas deseables, generación de plantas libres de enfermedades y virus, conservación de plantas en peligro de extinción, generación de metabolitos secundarios (Aponte , 2014; Levitus *et al.*, 2010).

### **2.8.2 Ventajas y desventajas de cultivo *in vitro***

De las ventajas y desventajas de cultivo *in vitro* las siguientes se aplicarían en la micropropagación de mortiño:

Ventajas:

- Se puede regenerar un gran número de plantas partiendo de una pequeña cantidad de tejido (fragmentos de hojas, raíces, tallos, entre otros) que en el caso de mortiño fueron *in vitro* plántulas con meristemas apicales.
- Se requiere de un espacio físico reducido para su almacenamiento.
- Permite obtener plantas libres de bacterias, hongos y virus, ya que esta técnica se realiza en condiciones asépticas (Aponte, 2014).

Desventajas:

- Las plantas producidas mediante esta técnica son fotosintéticamente deficientes por lo que debe haber un control en factores como: luz, agua, humedad, temperatura y luz al momento de la transición *in vitro* a campo (Aponte , 2014).

### **2.8.3 Fases de la micropropagación *in vitro***

Etapa 0 Etapa de preparación:

Esta etapa se basa en la elección y preparación del explante, ya que estas actividades evitan contaminación (bacterias y hongos) y oxidación de explante. Para ello se aplican químicos como bactericidas, desinfectantes y fungicidas para el control de organismos patógenos (Cañal *et al.*, 2001).

Etapa 1 o Establecimiento:

En esta etapa se establecen cultivos viables, mediante la transferencia de los explantes en forma aséptica a los medios de cultivo. Una vez que los explantes sobreviven sin que exista contaminación y además que no presenten síntomas de oxidación se considera un éxito (Aponte , 2014; Cañal *et al.*, 2001).

Etapa 2 o Multiplicación

El objetivo de esta etapa es incrementar el número de brotes realizando una serie de subcultivos; Para estimular el crecimiento de los nuevos explantes se utiliza reguladores de crecimiento (citoquininas y auxinas) (Aponte , 2014). Este proceso es realizado en una cámara de flujo laminar u otro lugar que permita mantener las condiciones de asepsia necesarias (Castillo , 2008). Los tubos de ensayo o envases son destapados, para, con la ayuda de una pinza sacar la plántula en su interior; La vitro planta es colocada en papel esterilizado y a continuación, con la ayuda de un bisturí, se procede a realizar en ella pequeños cortes para generar explantes con un nudo (yema) y un pedazo corto de tallo; los cortes deben ser horizontales para que se produzca un mejor enraizamiento (Pacheco , 2005) . Los brotes deben ser subcultivados periódicamente y

puestos en nuevos medios en tubos de ensayo u otro recipiente que se adecúe para el tipo de planta; La cantidad de plantas a obtener va depender de la especie vegetal utilizada (Castillo , 2008).

Etapa 3 o Enraizamiento:

Esta etapa tiene como objetivo producir raíces adventicias y puede realizarse en dos condiciones *ex o in vitro*. Para el caso de *in vitro*, se pueden utilizar diferentes substratos y hormonas. En cambio, con el proceso *ex vitro* se logra realizar los procesos de enraizamiento y aclimatación simultáneamente. (Cañal *et al.*, 2001)

Etapa 4 o Aclimatación:

Esta es la etapa más crítica del proceso, ya que las plantas salen de condiciones estériles y de un ambiente rico en nutrientes que encuentran en el tubo de ensayo para empezar con su autodesarrollo en tierra (Aponte, 20014).

#### **2.8.4 Condiciones Ambientales**

Es una combinación de nutrientes (carbohidratos, aminoácidos, sales orgánicas y vitaminas) y agua, suplementado con reguladores de crecimiento de estructura líquida, sólida u semisólida (Levitus *et al.*, 2010). Los componentes utilizados en el medio pueden variar dependiendo de la etapa en la que se encuentre el explante durante la propagación; La concentración y cantidad de los elementos que conforman el medio determina la diferencia entre las diferentes fórmulas (Rojas *et al.*, 2004). Uno de los medios más conocidos es el Murashige y Skoog (MS), que se elaboró tomando como referencia el cultivo *in vitro* de tabaco, se utiliza en la mayoría de especies con excepción de las que presentan sensibilidad a la salinidad (Pelacho *et al.*, 2005), ya que este medio es considerado como rico en sales por su concentración de iones de cloro Cl<sup>-</sup> (6.0 mM), iones amonio NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (20.6 mM), iones de MoO<sub>4</sub><sup>-</sup> (1.0 mM) e iones de nitrato NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (39.4 mM). En el caso de plantas leñosas y arbustivas el medio que se usa es el Woody Plant (WPM) ya que posee baja concentración de sales NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (5 mM), Cl<sup>-</sup> (1.3 mM) y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (9.7 mM) (Villegas *et al.*, 2015).

## 2.9 Medio de cultivo

Es una combinación de nutrientes (carbohidratos, aminoácidos, sales orgánicas y vitaminas) y agua, suplementado con reguladores de crecimiento de estructura líquida, sólida u semisólida (Levitus *et al.*, 2010). Los componentes utilizados en el medio pueden variar dependiendo de la etapa en la que se encuentre el explante durante la propagación; La concentración y cantidad de los elementos que conforman el medio determina la diferencia entre las diferentes fórmulas (Rojas *et al.*, 2004). Uno de los medios más conocidos es el Murashige y Skoog (MS), que se elaboró tomando como referencia el cultivo in vitro de tabaco, se utiliza en la mayoría de especies con excepción de las que presentan sensibilidad a la salinidad (Pelacho *et al.*, 2005), ya que este medio es considerado como rico en sales por su concentración de iones de cloro  $\text{Cl}^-$  (6.0 mM), iones amonio  $\text{NH}_4^+$  (20.6 mM), iones de  $\text{MoO}_4^-$  (1.0 mM) e iones de nitrato  $\text{NO}_3^-$  (39.4 mM). En el caso de plantas leñosas y arbustivas el medio que se usa es el Woody Plant (WPM) ya que posee baja concentración de sales  $\text{NH}_4^+$  (5 mM),  $\text{Cl}^-$  (1.3 mM) y  $\text{NO}_3^-$  (9.7 mM) (Villegas *et al.*, 2015).

### 2.9.1 Composición de los medios de cultivo

Sales minerales, se pueden clasificar en:

Macro-elementos: compuestos que la planta requiere en mayor cantidad como: nitrógenos(N), fósforo (P) potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre(S) (Aponte, 2014).

Micro-elementos: Son elementos esenciales, se encuentran en las plantas en dosis bajas. Los micronutrientes de relevancia son: zinc (Zn), molibdeno (Mo), cobre (Cu), boro (B), manganeso (Mn), cobalto (Co) y hierro (Fe). El exceso de estos compuestos puede ocasionar toxicidad de los explantes (Aponte, 2014). En el caso de especies leñosas el medio más recomendable es el WPM (WoodyPlant Medium) por su bajo contenido de sales (Ramos, 2012).

Fuentes de carbono:

Los azúcares proporcionan elementos esenciales como: carbono, hidrógeno y oxígeno. Estos compuestos se generan de manera natural en la planta a raíz de la fotosíntesis, sin embargo, en cultivo *in vitro* debido a la falta de intensidad de luz, las plantas no pueden generar la cantidad adecuada de carbohidratos, debido a ello, se añade del 2 al 5% de azúcares en el medio de cultivo (Levitus *et al.*, 2010; Aponte, 2014).

#### Vitaminas

Compuestos orgánicos que intervienen en procesos de crecimiento y diferenciación celular, es decir, cumplen funciones de catalizadores metabólicos (Sharry *et al.*, 2015). La vitamina que tiene mayor influencia en el crecimiento adecuado de los cultivos es la tiamina, aunque, también se utilizan: el ácido nicotínico y la piridoxina (Levitus *et al.*, 2010; Aponte, 2014).

#### Sustancias gelificantes

Son utilizados para proporcionar una textura semisólida o sólida al medio de cultivo para que los explantes permanezcan en una posición fija; El agente gelificante más utilizado es el agar, obtenido mediante algas marinas, seguido de la agarosa que es un componente de mayor pureza, también, están el gelrite y phytigel que son agares con altos estándares de calidad y pureza (Aponte, 2014).

#### Reguladores de crecimiento:

Compuestos químicos encargados de los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas.

- Auxinas: Conjunto de hormonas que en cultivo *in vitro* intervienen en procesos de crecimiento, desarrollo, división celular y diferenciación de raíces. Este tipo de hormonas son sintetizadas de forma natural y sintética. Entre las naturales tenemos ácido 4-cloro-indolacético (4-ClIAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico. La manera de actuar de estos componentes es la plasticidad de la pared celular permitiendo que la célula se expanda (Aponte, 2014 ; Llorente, 2000).

- Citoquininas: Actúan en procesos de división celular, retardan el proceso de senescencia en hojas, inducen la formación de brotes laterales, intervienen en procesos de síntesis de proteínas, retardan procesos de degeneración celular e inducen la proliferación de tallos y yemas laterales. Se debe tener en cuenta que el equilibrio entre auxinas y citoquininas controla el proceso de organogénesis por lo que se debe definir las concentraciones de estas sustancias según la finalidad del trabajo, la especie y variedad de planta (Llorente , 2000; Aponte , 2014). Las citoquininas utilizadas durante el proceso de investigación fueron:
  - Zeatina: se obtiene de la leche de coco. Estimula la división lateral, la germinación de semilla y el inicio del callo e incentiva el crecimiento de yemas laterales. Origina brotaciones múltiples de entrenudos y raíces con una distribución de alta frecuencia (SIGMA, s.f.).
  - Zip (6- $\gamma$ ,  $\gamma$ -Dimethylallylamino purine): Derivada del *Clostridium tumerfacienses* un precursor de la zeatina y ayuda a la propagación de cultivo in vitro de microbrotes (SIGMA, s.f. ;Sharry *et al.*, 2015).
  - Gibelerinas: Estos compuestos controlan procesos como: la germinación de semillas, el desarrollo de raíces, la elongación de tallos y entrenudos, la floración y crecimiento meristemático y de partes sub apicales. Los explantes en su mayoría producen la cantidad suficiente de este conjunto de hormonas (Aponte , 2014; Llorente , 2000).

### **2.9.2 Micropropagación *in vitro* en otros arándanos**

Los primeros reportes de cultivo *in vitro* de especies de *Vaccinium* corresponden a Reed y Abdelnour en el año 1991, quienes ensayaron esta técnica sometiendo brotes a dos condiciones ambientales y cuatro tratamientos con citoquininas. En 1992, Rowland y Ogden contrastaron medios de cultivos suplementados con ribosa de zeatina versus medios de cultivo suplementados con dosis de Zip para identificar su efectividad en la regeneración de brotes adventicios de *Vaccinium corybosum*. En el año 2000, Cao y Hammerschlag, establecieron las condiciones adecuadas para la organogénesis de explantes de hojas en el cultivo de Bluecorp (*V. corymbosum*). En el año 2002, Jaakola y

otros describieron que para la multiplicación de “bilberry” (*V. myrtillus*) y “lingoberry” (*V. vitis-idaea*), específicamente en la fase de iniciación del enraizamiento de brotes micropropagados influye en gran medida las hormonas (citoquininas) y la estación. Para el año 2003, Ciao y otros estudiaron como los niveles de sacarosa influyen en la proliferación de yemas axilares. En el 2004, un grupo de investigadores liderado por Ostrolucká lograron conseguir en las especies de *Vaccinium* la generación de meristemas mediante el uso de medios que contenían 2 mgL<sup>-1</sup> de zeatina concluyendo que esta hormona es la óptima para motivar la multiplicación de brotes de esta especie. Simultáneamente Yadong y otros indicaron que la hormona CPPU genera mayor cantidad de hojas (41 hojas) en comparación con zeatina que produjo 30 hojas en las variedades: Sunrise (*V. corymbosum Sunrise*) y GeorgianGem (*V. corymbosum Georgia Gem*). Pereira en el año 2006, describió, además, que otro método que ha resultado eficiente para la micropropagación de brotes *in vitro* es mediante el uso de zeatina en dosis de 12.3 combinada con 12.6 μM de 2iP en el medio Zimmerman and Brome, también, se reportó que los brotes que fueron enraizados en este medio suplementados con 2ip tuvieron sobrevivencia del 99%. En el mismo año Kaldmäe y colaboradores establecieron que la multiplicación *in vitro* para el caso de *Vaccinium angustifolium* está dada por las condiciones fisiológicas de la planta madre. En el año 2007 Meiners lideró un grupo de investigación para identificar la interacción de reguladores de crecimiento en Woody Plant Medium obteniendo como resultado que con zeatina, un 51% de los explantes instaurados desarrollaron brotes, mientras que, con la interacción entre zeatina y 2ip el 47% de los nódulos desarrollaron brotes, Para el caso de 2ip se tuvo que casi el 53% de brotes sobrevivieron y el 40% desarrollaron brotes. Ya en el año 2009, Debnath, investigó el efecto del uso de TDZ respecto a la polaridad de los explantes en brotes adventicios (Mora, 2010) .En el caso de *Vaccinium meridionale* Rache y Pacheco (2010) reportan una viabilidad del 88-100% de plántulas obtenidas luego de la etapa de aclimatación, cuando el enraizamiento de brotes se indujo *in vitro*. Sin embargo, Castro *et al.* (2013) obtiene 66-80% de enraizamiento en condiciones

*ex vitro*, teniendo como mejor resultado el uso de AIB (Ácido indolbutírico) que alcanza una supervivencia del 80% en el periodo de adaptación

### **2.9.3 Micropropagación *Vaccinium floribundum* Kunth**

En el año 2008, en la Universidad San Francisco de Quito se llevó a cabo una investigación denominada “Cultivo *in vitro* de mortiño”, en la cual se buscó obtener un protocolo eficiente para lograr la micropropagación de plantas mediante la técnica de cultivo *in vitro*. En dicha investigación se reportó que se obtuvieron resultados positivos en cuanto a un protocolo para la introducción de semillas y yemas axilares con el uso de altas dosis de reguladores de crecimiento, obteniendo mejores resultados con Ácido Naftalénico (NAA) y Tranzeatina (TZR). Sin embargo, no se logró obtener un protocolo eficiente para el proceso de aclimatación reportando mortalidad en todas las plantas. Tampoco lograron establecer un método para la regeneración de retoños adventicios, teniendo únicamente en algunos casos la formación de callo sin que se dé el proceso de regeneración (Trujillo, 2008). Continuando con la rama de investigación en micropropagación de mortiño F. Dueñas en el año 2017 desarrolló un protocolo para la introducción de semillas y callos apicales.

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1 Materiales

Los equipos, materiales y reactivos utilizados en la investigación se detallan a continuación:

##### **Material biológico**

Para la investigación se utilizaron *vitro* plantas provenientes de semillas, establecidas en la fase anterior del proyecto (Dueñas , 2017) (figura 1).



*Figura 1.* Vitro planta de mortiño proveniente de semilla sexual.

##### **Materiales de laboratorio**

- Agitador
- Bisturís
- Cajas Petri
- Cinta rolopack
- Frascos de vidrio 200 ml, 100 ml
- Fósforos
- Guantes y mascarillas
- Lámpara de alcohol
- Mandil
- Papel bond
- Papel aluminio

- Pipetas
- Pinzas
- Probetas
- Tubos de ensayo

### **Equipos de laboratorio**

- Agitadores orbitales
- Agitadores magnéticos
- Autoclave
- Balanza de precisión
- Cámara de flujo laminar
- Cuarto de crecimiento
- Destilador de agua
- Dispensador de medios
- pH metro
- Refrigerador

### **Reactivos**

- Alcohol
- Agar
- Agua destilada
- Sacarosa
- WoodyPlant Medium (WPM)
- Zeatina
- Zip

## **3.2 Características del sitio experimental**

### **3.2.1 Ubicación**

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina, del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

### 3.2.2 Características del lugar experimental

Tabla 2.

*Características del lugar experimental.*

Provincia	Pichincha
Cantón	Mejía
Parroquia	Cutuglagua
Altitud	3058
	m.s.n.m.
Latitud	00°22'00" S
Longitud	79°32'00" O
Temperatura promedio anual	11.3 ° C
Precipitación promedio anual	1140.6 mm
Humedad relativa	84.3 %

Tomado de: INIAP, 2018.

### 3.3 Características del laboratorio

Tabla 3.

*Características del cuarto de crecimiento de cultivo de tejidos vegetales.*

Temperatura promedio	20±2°C
Fotoperiodo	16/0 horas luz
Intensidad de luz	42-48 μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>
Humedad relativa	40%

Tomado de: INIAP, 2018.

### **3.4 Metodología**

#### **3.4.1 Multiplicación *in vitro***

Para la ejecución de esta etapa se utilizaron *in vitro* plantas con meristemos apicales. La multiplicación estuvo constituida por dos subcultivos, los cuales se establecieron con la interacción entre reguladores de crecimiento (zeatina y 2ip), dosis (alta y baja) y condiciones ambientales de desarrollo con el factor de fotoperiodo (16 y 0 horas luz), el tiempo de estudio fue de 60 días, durante los cuales las plántulas fueron monitoreadas realizando una toma de datos cada 10 días.

#### **3.4.2 Primer subcultivo**

En una cámara de flujo se realizó el corte de las *in vitro* plantas en secciones nodales de 10 mm aproximadamente, las cuales posteriormente, fueron sembradas de manera individual en tubos de ensayo que contenían el medio de cultivo con su respectiva fitohormona (zeatina y 2ip) y dosis (alta y baja). Los tubos de ensayo fueron ubicados en estanterías, adaptadas para ofrecer la cantidad de luz establecida para las condiciones ambientales en estudio (16 y 0 Horas luz). Se evaluaron las siguientes variables: longitud de brote, número de brote y coeficiente de multiplicación. La evaluación del material se realizó durante 60 días.

#### **3.4.3 Segundo Subcultivo**

Al concluir el periodo de evaluación de 60 días se procedió a multiplicar los explantes obtenidos (segundo repique).

En una cámara de flujo se realizaron los cortes de las *in vitro* plantas individualizándolas, para proceder a sembrar 1 planta en cada tubo de ensayo, el cual contenía el medio cultivo con la hormona y la dosis respectiva.

### **3.5 Factores en estudio**

**Hormonas (2)**

**h1**=Zeatina (ZEA) (Gajdošová *et al.*, 2006)

**h2**= N<sup>6</sup>2 isopentenil- adenine (2iP) (Castro & Álvarez, 2013)

**Dosis (2)**

**d1**=Alta

**d2**=Baja

**Fotoperiodo (2)**

**f1**=16 horas luz

**f2**=0 horas luz

**3.6 Variables****Longitud de brote**

La longitud de brote se evaluó cada 10 días a partir de la fecha de siembra, midiendo la planta, desde la base que estuvo en contacto con el medio de cultivo hasta su ápice, usando para ello una regla graduada.

**Numero de brotes viables**

El número de brotes viables se evaluó a los 60 días para cada subcultivo, seleccionando los brotes que visualmente fueron vigorosos o con una longitud de <3 mm aproximadamente.

**Coeficiente de multiplicación**

El coeficiente de multiplicación se estableció del: número de brotes que presentó cada explante al inicio del periodo de estudio / el número de explantes una vez transcurrido el periodo de estudio.

**3.7 Unidad experimental**

La unidad experimental estuvo conformada por 1 vitro planta en un tubo de ensayo con medio de cultivo en estudio.

### 3.8 Tratamientos

Los tratamientos evaluados se indican en la tabla 4.

Tabla 4.

*Tratamientos para la multiplicación de vitro plántulas de mortiño en condiciones in vitro. INIAP. Cutuglagua. Pichincha 2018.*

Tratamiento	Código	Descripción
t1	h1d1f1	Zeatina + dosis alta+ 16 horas luz
t2	h1d1f2	Zeatina+ dosis alta + 0 horas luz
t3	h1d2f1	Zeatina+ dosis baja + 16 horas luz
t4	h1d2f2	Zeatina + dosis baja + 0 horas luz
t5	h2d1f1	2iP+ dosis alta+ 16 horas luz
t6	h2d1f2	2iP + dosis alta + 0 horas luz
t7	h2d2f1	2iP + dosis baja + 16 horas luz
t8	h2d2f2	2iP + dosis baja + 0 horas luz

Nota: Las letras de los tratamientos correspondientes a los códigos, se establecieron de la interacción entre los factores de estudio.

### 3.9 Diseño experimental y análisis funcional

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial 2x2x2 con 10 observaciones por cada tratamiento y la prueba de comparaciones múltiples (LSD) para analizar el tipo de hormona, dosis y fotoperiodo que se encuentran en estudio y sus interacciones.

### 3.10 Esquema de análisis de la varianza

Tabla 5.

*ADEVA para el ensayo de multiplicación del primer subcultivo de vitro plántulas de mortiño.*

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Grados de Libertad</b>
Total	79
Tratamientos	7
Hormonas (H)	1
Dosis (D)	1
HxD	1
Fotoperiodo (F)	1
HxF	1
DxF	1
HxDxF	1
EE	72

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Primer subcultivo: Análisis de variables

#### 4.1.1 Longitud de brote

A los 60 días de estudio, los resultados obtenidos para la variable longitud de brote (Figura 2), indican que el tratamiento con mejor resultado fue el T3 (zeatina 0.5 ppm con fotoperiodo de 16 horas luz) seguido del T4 (zeatina 0.5 pmm con fotoperiodo de 0 horas luz) alcanzando una longitud promedio de 5.8 y 5.7 mm respectivamente. Estos resultados se deben posiblemente a que la zeatina se comporta mejor en elongación del brote que 2ip, concordando con Ruziĉ (2012), quien reportó que, al utilizar 0,5 mg/L de zeatina y bajas concentraciones de IBA, los resultados fueron superiores en cuanto a elongación y multiplicación de brotes. Además, Rache y Pacheco (2012), reportaron que la concentración de 2ip utilizada en su investigación (59,09  $\mu\text{M}$ ) inhibió la elongación de brotes de *V. meridionale*.

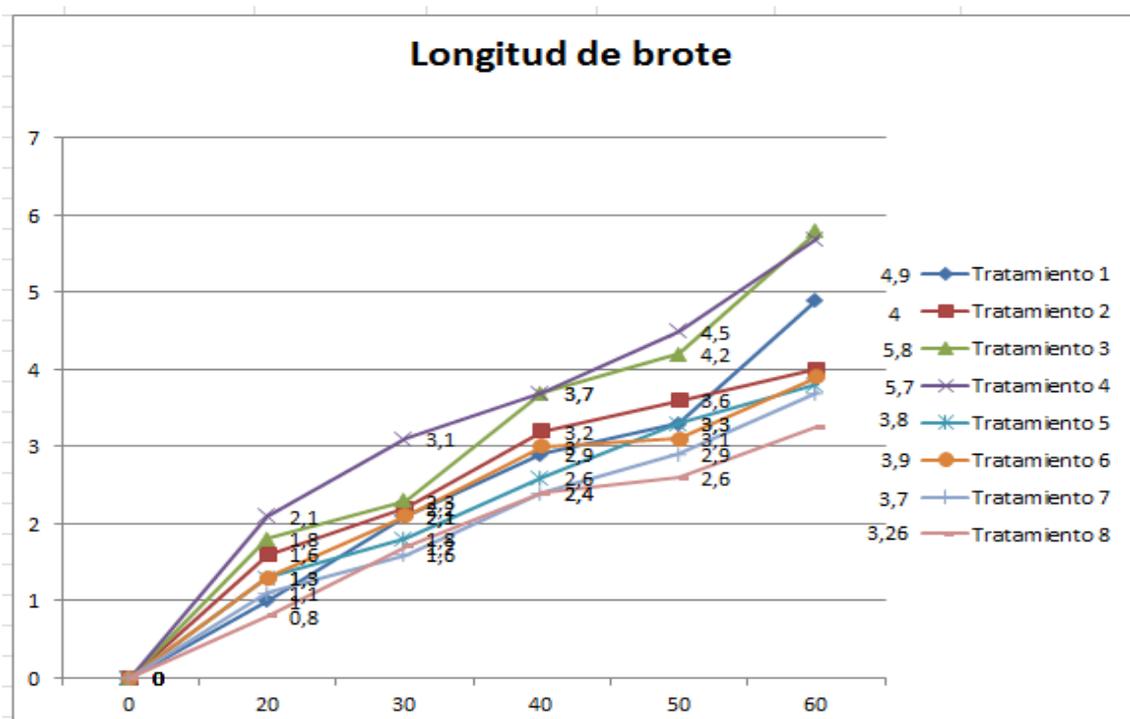


Figura 2. Longitud de brotes. INIAP, 2018.

Tabla 6.

*Resultados de longitud alcanzada por brotes a los 60 días (primer subcultivo).*

Tratamientos	Longitud de brote
1	4,9
2	4
3	5,8
4	5,7
5	3,8
6	3,9
7	3,7
8	3,26

#### 4.1.2 Coeficiente de multiplicación

Según el análisis ADEVA, para la variable de coeficiente de multiplicación a los 60 días, la tabla 7, muestra que, el factor hormona, así como, las interacciones hormona-dosis y hormona-fotoperiodo tuvieron diferencia significativa, mientras que, para los factores: dosis y fotoperiodo e interacciones dosis-fotoperiodo no existió significancia.

El promedio general fue de 2,98 % y el coeficiente de variación fue de 34,58%, que para este tipo de investigación es buena y posiblemente se produjo por la variabilidad genética del explante inicial.

Tabla 7.

*Análisis de varianza para el coeficiente de multiplicación del primer subcultivo.*

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Valor p
<b>Modelo</b>	7	33,75	4,82	4,56	0,0003
<b>Hormona</b>	1	16,20	16,20	15,31	0,0002
<b>Dosis</b>	1	2,45	2,45	2,31	0,1325
<b>Fotoperiodo</b>	1	2,45	2,45	2,31	0,1325
<b>Hormona x</b>	1	3,20	3,20	3,02	0,0863

<b>Dosis</b>						
<b>Hormona</b>	<b>x</b>	1	3,20	3,20	3,02	0,0863
<b>Fotoperiodo</b>						
<b>Dosis</b>	<b>x</b>	1	1,25	1,25	1,18	0,2808
<b>Fotoperiodo</b>						
<b>Hormona</b>	<b>x</b>	1	5,00	5,00	4,72	0,0330
<b>Dosis</b>	<b>x</b>					
<b>Fotoperiodo</b>						
<b>Error</b>		72	76,20	1,06		
<b>Total</b>		79	109,95			
<b>Coefficiente de variación</b>		34,58				

### Hormona

Según los datos obtenidos (Tabla 8), se muestra que, la mejor respuesta para el factor hormona en la variable coeficiente de multiplicación, se obtuvo con la hormona 1, correspondiente a zeatina, lo cual coincide con Ostrolucká *et al* (2007), quienes tuvieron éxito con el uso de esta hormona en la proliferación de *V. corybosum*, estos investigadores, también encontraron que los brotes sembrados en zeatina fueron superiores en cuanto a vigorosidad, lo que concuerda con este estudio, ya que físicamente los brotes en zeatina presentaron mayor vigor que los de Zip. Además en el año 1991 Reed reportó que la zeatina resultó ser mas eficiente para la iniciación de brotes en 8 de 12 genotipos de *Vaccinium* comparada con otras citoquinas como Zip.

Tabla 8.

*Test LSD Fisher al 5% para el factor hormona.*

<b>Hormona</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	<b>E.E</b>	
<b>1</b>	3,43	40	0,16	A
<b>2</b>	2,53	40	0,16	B

Nota: Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Dosis

Para la dosis de hormona, la tabla 9, indica que este factor no incide en la multiplicación de mortiño, sin embargo, la dosis baja (0.5 ppm) de zeatina, resultó ser más eficiente que la dosis alta en cuanto a coeficiente de multiplicación y longitud de brote, resultados similares a los presentados por Gajdošová *et al* (2006), quienes demostraron la eficacia de zeatina en bajas concentraciones (0,5 mg/L) para inducir la formación de brotes en cultivo de meristemas de *Vaccinium sp.* También Debnath en el 2004 reportó que con mayor cantidad de zeatina los brotes de dwarf raspberry (*Rubus Pubescens Raf.*) no se expandieron y tuvieron una alta tasa de mortalidad, otro estudio del investigador en el 2005, mostró su éxito al usar dosis bajas (1 y 2  $\mu\text{M}$ ) de zeatina para elongación y propagación de Lingonberry (*V. vitis-idaea*) respectivamente.

Tabla 9.

*Test LSD Fisher al 5% para el factor Dosis.*

Dosis	Medias	N	E.E	
1	2,80	40	0,16	A
2	3,15	40	0,16	A

Nota: Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ )

## Fotoperiodo

Como se muestra en la tabla 10, mediante el análisis de comparaciones múltiples LSD, se observó que la luz no incidió en la multiplicación *in vitro* de mortiño, a diferencia de lo obtenido por Trujillo, 2008 y Dueñas (2017), quienes concluyeron que en la fase de establecimiento *in vitro* de semillas la luz fue un factor determinante para estimular su germinación.

Durante el estudio, se observó que la mayoría de plantas (52.5%), que se encontraban en presencia de luz adquirieron una coloración rojiza (Figura 3) , lo cual, posiblemente se debe a la presencia de antocianinas, ya que al someter a la planta a una luz intensa se genera la acumulación de este compuesto que de manera eficaz absorbe la luz ultravioleta, por lo que se cree

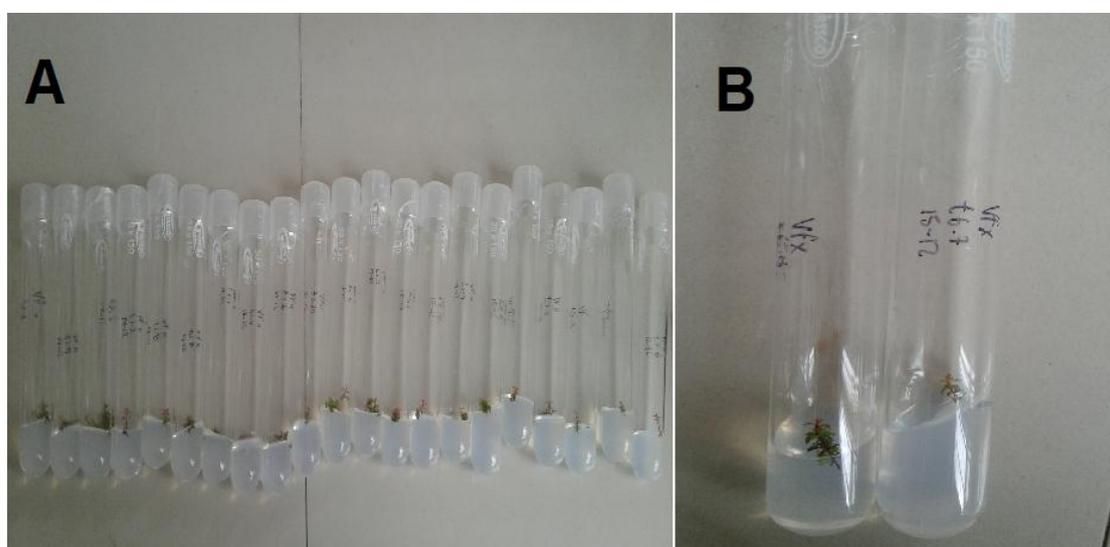
que actúa como protector solar, ya que las plantas que poseen esta coloración generalmente se encuentran en regiones con alta e intensa luminosidad (Gonzales, 2007).

Tabla 10.

*Test LSD Fisher al 5% para el factor Fotoperiodo.*

<b>Fotoperiodo</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	<b>E.E</b>	
<b>1</b>	3,15	40	0,16	A
<b>2</b>	2,80	40	0,16	A

Nota: Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ )



*Figura 3. Coloración rojiza en vitro plantas de mortiño.*

Nota: A) Explantes de coloración rojiza bajo un fotoperiodo de 16 horas luz, tratamientos: 1.1, 1.2, 1.3, 1.7, 1.8, 1.9, 3.3, 3.4, 3.6, 3.7, 3.9, 3.10, 5.4, 5.7, 5.9, 5.10, 7.2, 7.3, 7.6, 7.8 y 7.9.

B) Explantes de coloración rojiza en ausencia de fotoperiodo (0 horas luz), tratamientos: 6.7 y 6.9.

El análisis para la comparación entre factores LSD al 5%, para la interacción hormona, dosis y fotoperiodo arrojó que el tratamiento que alcanzo el mejor resultado fue el T3 (zeatina al 0.5 ppm en un fotoperiodo de 16 horas luz) (Tabla 11), lo que demuestra que los factores antes mencionados interactúan. Para el primer subcultivo se tuvo sobrevivencia del 100% de brotes.

Tabla 11.

*Test LSD Fisher al 5% para el factor Dosis.*

Tratamiento	Hormona	Dosis	Fotoperiodo	Medias	N	E.E	
T3	1	2	1	4,30	10	0,33	A
T4	1	2	2	3,30	10	0,33	B
T1	1	1	1	3,30	10	0,33	B
T5	2	1	1	2,90	10	0,33	B C
T8	2	2	2	2,90	10	0,33	B C
T2	1	1	2	2,80	10	0,33	B C
T6	2	1	2	2,20	10	0,33	C
T7	2	2	1	2,10	10	0,33	C

Nota: Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Numero de brotes viables:** Los datos obtenidos en número de brotes fueron utilizados para establecer el coeficiente de multiplicación que resulta de la división: número de brotes iniciales/ número de brotes finales, es decir que los datos son los mismos en las dos variables.

#### 4.2 Segundo subcultivo: Análisis de variables

En el segundo subcultivo se observó que los resultados siguieron la misma tendencia que en el primero.

Para la variable longitud de brote tenemos que los mejores tratamientos son el T1 (zeatina 1 ppm en fotoperiodo de 16 horas luz) y el T2 (zeatina 1 ppm en fotoperiodo de 0 horas luz) (Fig. 4) (Tabla 12), al realizar una comparación con el primer subcultivo podemos notar una pequeña variabilidad en la dosis a usar ya que en el primer ciclo los brotes presentaron resultados superiores con dosis bajas. Estos resultados pueden deberse a que las plantas provenían de un medio de cultivo con hormona. Sin embargo, la interacción de la zeatina con los brotes nuevamente resultó ser la mejor opción.



3	(3,27 mm)
4	(3,06 mm)
5	(3,64 mm)
6	(2,35 mm)
7	(3,35 mm)
8	(3,32 mm)

Para la variable coeficiente de multiplicación, al igual que en la primera etapa tenemos que la zeatina es la hormona con los mejores resultados teniendo a T3 (zeatina 0.5 ppm con un fotoperiodo de 16 horas) y T4 (zeatina 0.5 ppm con un fotoperiodo de 16 horas) como los tratamientos mas eficientes (Fig. 5), lo que posiblemente estuvo asociado con la influencia de esta hormona en la actividad de división celular (Letham, 1963). Además, Ostrolucká y otros en el 2002, reportaron que la zeatina mostró una influencia positiva sobre la intensidad de la proliferación y el crecimiento de brotes en cultivo de *V. corybisum* L.

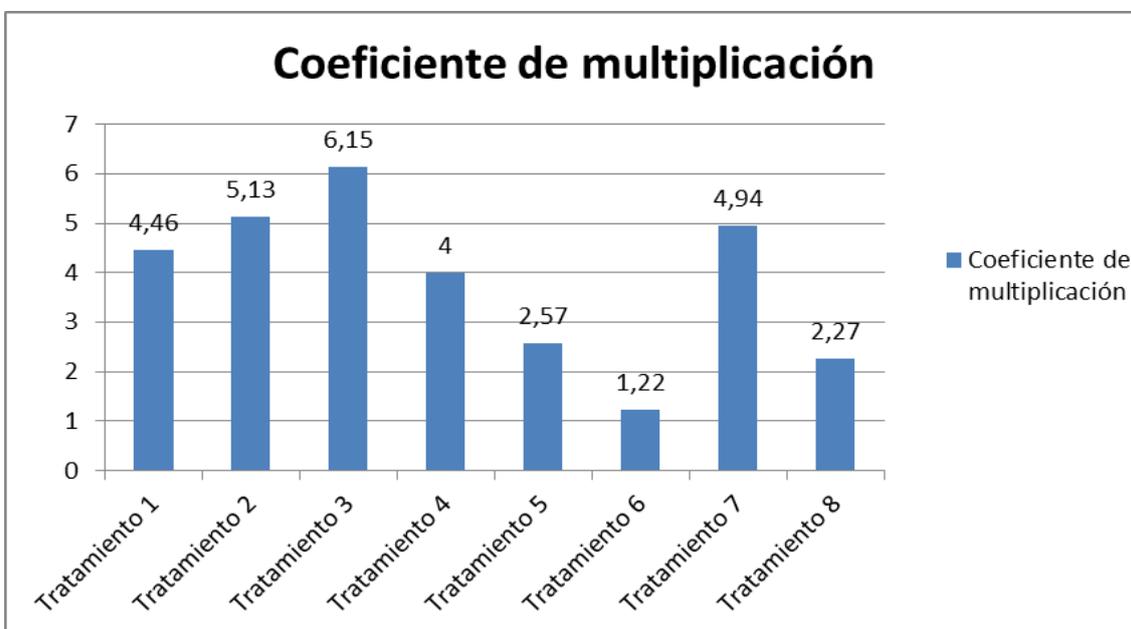


Figura 5. Coeficiente de multiplicación segundo subcultivo.

Tabla 13.

*Coeficiente de multiplicación de brote de V. floribundum Kunth en el segundo subcultivo.*

Tratamientos	Coeficiente de multiplicación
1	4,46
2	5,13
3	6,15
4	4
5	2,57
6	1,22
7	4,94
8	2,27

## **5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1 Conclusiones**

Los resultados obtenidos en el estudio indican que el material vegetal de mortiño respondió eficientemente al proceso de micropropagación *in vitro*, por lo tanto, se aplica la hipótesis alternativa.

Para la micropropagación *in vitro* de mortiño el mejor tratamiento resultó el T3 (zeatina a una concentración de 0,5 ppm en fotoperiodo de 16 horas), del cual se obtuvo los mejores resultados en cuanto a longitud de brote y coeficiente de multiplicación

El fotoperiodo no influyó de manera determinante en la multiplicación de *in vitro* plantas de mortiño, ya que no se observaron diferencias significativas entre los brotes en presencia y ausencia de luz.

### **5.2 Recomendaciones**

Probar la fase de multiplicación con brotes que no provengan de semillas para realizar una comparación con las respuestas obtenidas en esta fase.

Para la multiplicación utilizar brotes que visualmente sean vigorosos o con un tamaño mínimo de 3 mm, ya que estos disminuyen la tasa de mortalidad.

Para futuras investigaciones se recomienda aumentar el tiempo de transición entre subcultivos, lo cual permitiría que los brotes adquirieran mayor longitud y vigorosidad.

## REFERENCIAS

- Abreu, A., Cuéllar, A., & Prieto, S. (2008). Fitoquímica del género *Vaccinium* (Ericaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.
- Agencia de Noticias UN. (2011). Universidad Nacional de Colombia. Recuperado el 23 de Mayo de 2018, de <http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/arranca-la-propagacion-del-agraz.html>
- Aguilar, Z., Hidalgo, P., & Ulloa, C. (2009). *Plantas Útiles de los Páramos de Zuleta, Ecuador*. Quito: PPA-EcoCiencia. Quito.
- Aponte, K. (2014). Establecimiento de un protocolo para la obtención en laboratorio de vitro plantas de alta calidad fitosanitaria de dos cultivares comerciales de malanga (*Xsanthosoma* spp.) de la Amazonía. Quito: Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Aponte, K. (2014). Establecimiento de un protocolo para la obtención en laboratorio de vitro plantas de alta calidad fitosanitaria de dos cultivares comerciales de malanga (*Xsanthosoma* spp.) de la Amazonía. Quito: Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Armas, C. (2013). VARIACIÓN DE ÍNDICES DE CALIDAD DE MORTIÑO (*Vaccinium floribundum*) Y UVILLA ORGÁNICA (*Physalis peruviana*) TRATADOS CON RADIACIÓN UV-C. Quito: Universidad tecnológica Equinoccial.
- Ayala, K. (2017). Caracterización morfológica del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) en la Sierra Norte del Ecuador. Quito: Universidad De las Américas.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía mesoamericana*.
- Cámara de Comercio Hispano Colombiana. (2017). CAMACOES. Recuperado el 23 de Mayo de 2018, de

<http://www.camaco.es.com.co/index.php/actividades-camaco.es/noticias-camaco.es/item/agraz-el-fruto-silvestre-que-toma-fuerza>

- Cañal, M., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez, R., & Majada, J. (2001). Fisiología del cultivo in vitro. *Biotecnología vegetal*, 20074-8647.
- Cao, X., & Hammerschlag, F. (2000). *Improved shoot Organogenesis from Leaf Explants of Highblush Blueberry*. *Hortscience*.
- Cao, X., Fordham, I., Douglas, U., & Hammerschlag, F. (2003). *Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from in vitro propagated highbush blueberry shoots*. *Plant cell tissue organ cult.*
- Castillo, A. (2008). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA.
- Castro, D., & Álvarez, J. (2013). Micripropagación clonal de tres genotipos de mortiño, *Vaccinium Meridionale Sw.*, por Proliferación de yemas axilares. *Actual Biol.*
- Chaparro, M., & Becerra, N. (1999). Anatomía del fruto *Vaccinium floribundum* (ERICACEAE). *Acta biológica Colombiana*.
- Chiluisa, V. (2015). *Vaccinium floribundum* Kunth, reserva de antocianinas en los páramos. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Coba, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). Estudio Etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja*, vol. 16.
- Debnath, S. (2004). *Clonal propagation of dwarf raspberry (Rubus pebescens Raf.) through in vitro axillary shoot proliferation*. *Plant Growth Regulation*.
- Debnath, S. (2009). *A two step procedure for adventitious shoot regeneration on excised leaves of lowbush*. *In vitro cell dev. biol.*

- Dueñas , F. (2017). Establecimiento in vitro del frutal Andino (*Vaccinium floribundum* Kunth) para la aplicación de agrotecnologías de multiplicación acelerada. Quito: Universidad de las Américas.
- Gajdošová, A., Ostrolucká, M., Libiaková, G., & Šimala , D. (2006). *Microclonal propagation of Vaccinium sp. and Rubus sp. and Detection of genetic variability in culture in vitro. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* , Vol. 14.
- Gaviria, C., Ochoa, C., Sanchez, N., Medina, C., Galeano, P., Mosquera, A., y otros. (2009). Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño en la zona altoandina de Colombia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Gomez, C. (2004). Autoecología del mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw.). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Gonzales, F. (2007). Fotosíntesis sin clorofila. Obtenido de Blogger: <http://fgonzalesh.blogspot.com/2007/06/fotosintesis-sin-clorofila-y-las.html>
- González , L. (2002). Propagación y productos del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), Proyecto Páramo Andino-ECOPAR. Riobamba: Ecuador.
- Hernandez, J. (2010). Caracterización físico química del fruto de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw.). Medellín: Universidad Nacional .
- Jaakola, L., Tolvaven, K., & Hohtola, A. (2002). *Micropropagation of Bilberry and Lingonberry*. Acta Horticulturae.
- Letham, D. (1963). *Zeatin, a factor inducing cell division isolated from ZEA MAYSA. Life science* No. 8.
- Levitus , G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). Biotecnología y Mejoramiento vegetal. Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la Biotecnología.

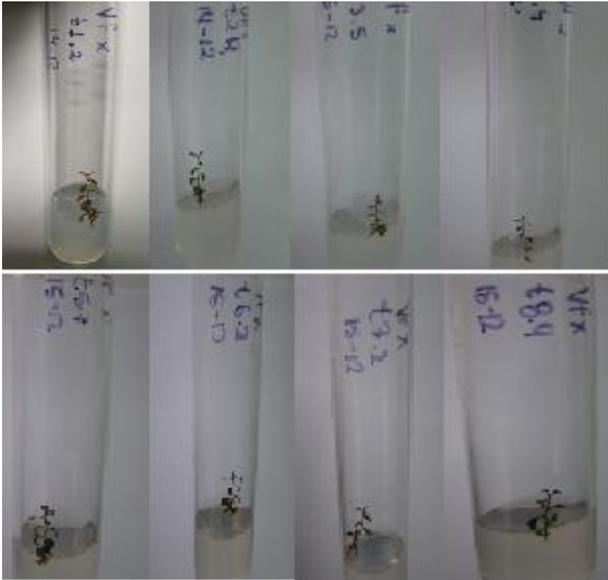
- Llorente , B. (2000). Aislamiento, purificación, caracterización y producción in vitro de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de la Plata.
- Luteyn, J., & Pedraza-Peñalosa, P. (2012). *Blueberry relatives of the New World tropics(Ericaceae)*. Bronx, New York: The New York Botanical Garden.
- Meiners , J., Schwab, M., & Szankowski. (2007). *Efficient in vitro regeneration systems for Vaccinium species*. . *Plant cells Tiss Org*.
- Mora, H. (2010). "ORGANOGENESIS in vitro DE ARÁNDANO *Vaccinium corybosum* L. Michoacán: Instituto Politécnico Nacional.
- Moreta, M. (2016). En Sigchos se elabora vino de mortiño. Recuperado el 23 de mayo del 2018, de: <https://www.revistalideres.ec/lideres/sigchos-empresas-vino-mortino-cotopaxi.html>.
- Noboa, V. (2010). Efecto de seis tipos de sustratos y tres dosis de ácido  $\alpha$  Naftalenacético en la propagación vegetativa de mortiño . Riobamaba, Ecuador : Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Ostrolucká, M., Gajdošová, A., & Libiaková, G. (2002). *Influences of zeatin on microclonal propagation of Vaccinium corybosum L. Propagation of Ornamental Plants*.
- Ostrolucká, M., Gajdošová, A., Libiaková, G., & Bežo, M. (2007). *Protocol for Micropropagation of Selected Vaccinium spp. Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*.
- Ostrolucká, M., Libiaková, G., Ondrušková, E., & Gajdošová, A. (2004). *In vitro propagation of Vaccinium species. Acta Universitatis Latviensis, Biology*, Vol. 676.
- Pacheco , V. (2005). Determinación de una metodología de desinfección y un medio de cultivo para la introducción y micropropagación in vitro de once ecotipos de curcubitas y cuatro de passifloras. Latacunga, Ecuador: Universidad Técnica de Ctoropaxi.

- Pereira , M. (2006). *Conservation of Vaccinium cylindraceum smith (ericeae) by micropropagation using seedling nodal explants . Society by in vitro biology.*
- Perez, S., & Valdivieso, S. (2007). COLECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA INSITU DEL MORTIÑO (*Vaccinium floribundum* Kunt) EN LA SIERRA NORTE DE ECUADOR. Quito: ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO.
- Perugorria, M. (2012). Desarrollo de una técnica para micropropagación de especies leñosas en bioreactores. Uruguay: Universidad de la República.
- Pino, C. (2007). Descripción del desarrollo vegetativo y de las características físicas y químicas de los frutos de cuatro clones de arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.) . Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile.
- Quingalomo, B. (2010). Investigación de productos autóctonos del Cantón Mejía (uvilla, mortiño) para su utilización dentro de la repostería. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Rache , L., & Pacheco, J. (2010). Propagación in vitro de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae).
- Ramos , J. (2012). Avances de la propagación in vitro de plantas leñosas. Bogotá, Colombia: UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA .
- RedAgricola. (2017). Los arandanos. Recuperado el 23 de Mayo de 2018, de <http://www.redagricola.com/pe/biloxi-la-red-globe-los-arandanos/>
- Reed, B. (1991). *The use of zaetin to initiate in vitro cultures of vaccinium species and cultivars. Hortscience.*
- Reed, B., & Abdeltour, A. (1991). *The use of zeatina to initiate in vitro cultures of Vaccinium species and cultivars. Hortscience.*

- Riofrio, C. (2010). Elaboración de gomas masticables de mortiño como fuente de vitamina para preescolares determinando su aporte nutricional y analisis . Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Rocha, P. (2011). Agro-bio-tecnologías: herramientas bio-lógicas al servicio de la agricultura. COMUIICA.
- Rodriguez, A. (2015). La producción de uvilla y mortiño crece en el cantón Cotacachi.
- Roldán , S. (2012). CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, FUNCIONAL Y ESTUDIO POST COSECHA DEL MORTIÑO (*Vaccinium Floribundum* Kunth) DE LA COMUNIDAD DE QUITICUSIG DEL CANTON SIGCHOS DE LA PROVINCIA DE COTOPAXI. QUITO: Escuela Politécnica Nacional.
- Rowland, L., & Ogden, E. (1992). *Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf section of Highbush blueberry. Hortscience.*
- Ruiz, H. (2011). Desarrollo de un vino de mortiño( arándanos) en la corporación Grupo Salinas. . Pamplona: Universidad pública de Navarra.
- Ruskin, F. (1989). *Lost Crops of the Incas. Washington: National Academy of Sciences.*
- Ruziĉ, D. (2012). *Micropropagation in vitro of highbush blueberry. Journal of Berry Research .*
- Sanjinés, A., Øllgaard, B., & Balslev, H. (2006). Frutos Comestibles. Botánica Económica de los Andes Centrales.
- Sharry , S., Adema, M., & Abedini , W. (2015). Plantas de probeta. La Plata, Argentina: Universidad Nacional de La Plata (EDULP) .
- SIGMA, A. (s.f.). SIGMA ALDRICH. Recuperado el 23 de mayo del 2018, de: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d5912?lang=en&region=EC>

- Trujillo, D. (2008). Cultivo in vitro de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). Quito: Universidad San Francisco.
- Vander, S., & Cabilio, P. (1996). *Ten year study of annual variation in berry and seed production in a population of Vaccinium corymbosum L. Am Midl Nat.*
- Vasco, C. (2009). *Phenolic compounds in Ecuadorian Fruits. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences .*

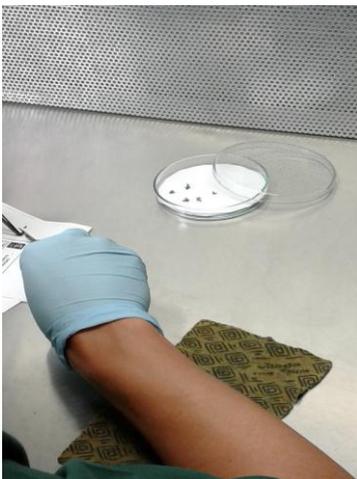
# **ANEXOS**



Anexo 1: Tratamientos día 0 subcultivo 1. Primera columna tratamientos con zeatina y segunda columna tratamientos 2ip.



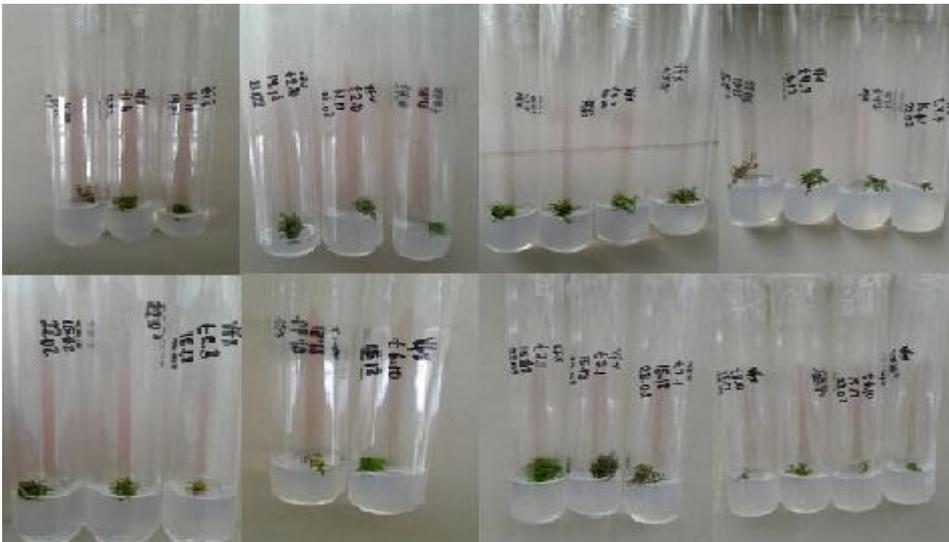
Anexo 2: Tratamientos ubicados en el cuarto de crecimiento de cultivo de tejido



Anexo 4: Proceso de multiplicación de mortiño



Anexo 5: Cámara de flujo laminar dispuesta para proceso de multiplicación



Anexo 6: Tratamientos día 60, segundo subcultivo. Primera columna tratamientos con zeatina (1,2,3 y 4), segunda columna tratamientos con 2 ip (5,6,7 y 8).

