



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE LA CALLOGÉNESIS COMO ALTERNATIVA DE
PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL MORTIÑO (*Vaccinium floribundum* KUNTH)

Autor

Fabricio Xavier Egas Castro

Año
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE LA CALLOGÉNESIS COMO ALTERNATIVA DE
PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL MORTIÑO (*Vaccinium floribundum* KUNTH)

Trabajo de Titulación en conformidad con los requisitos establecidos para optar
por el título de Ingeniero en Biotecnología

Profesor Guía

Ph. D. Wilson Arturo Vásquez Castillo

Autor

Fabricio Xavier Egas Castro

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación de la callogénesis como alternativa de propagación *in vitro* del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), a través de reuniones periódicas con el estudiante Fabricio Xavier Egas Castro, en el semestre 201910, 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".

Wilson Arturo Vásquez Castillo
Doctor en Fisiología de plantas
CC: 1001186210

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Evaluación de la callogénesis como alternativa de propagación *in vitro* del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), del estudiante Fabricio Xavier Egas Castro, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Wilson David Tapia López
Máster Universitario en Gestión y Planificación ambiental
CC: 1714205281

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

"Declaro haber dirigido científicamente al estudiante Fabricio Xavier Egas Castro, para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos ".

Luis Eduardo Morillo Velasteguí
Doctor en Recursos Fitogenéticos e Interacciones Biológicas
CC: 1708207632

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 ".

Fabricio Xavier Egas Castro
CC: 1718395898

AGRADECIMIENTOS

PhD Eduardo Morillo, director de biotecnología del INIAP. Al Ing. Santiago Meneses, por sus enseñanzas. A la Sra. "Geito" por su apoyo y motivación.

PhD Wilson Vásquez y Ms. C. Wilson Tapia por su orientación y correcciones en el trabajo escrito.

DEDICATORIA

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional, por ser luz en mi vida y mi fuerza para haber culminado esta etapa de mi vida.

A mis amigos, por los momentos compartidos a lo largo de la carrera.

RESUMEN

El mortiño (*Vaccinium floribundum*) es una baya silvestre que crece en los páramos ecuatorianos sobre los 3400 msnm, es rico en antioxidantes naturales y muy cotizado por su sabor, propiedades medicinales y nutricionales. En la actualidad, no existen cultivos domesticados ni métodos de propagación eficientes para producir plantas, debido a las limitaciones para su establecimiento. En el presente estudio se probó una alternativa para la micropropagación de mortiño, para esto, se evaluó la respuesta del material vegetal a callogénesis, en diferentes medios, con el uso de reguladores de crecimiento en distintas concentraciones, y sometidas a diferentes fotoperiodos.

La inducción de callos de mortiño se realizó evaluando 12 tratamientos con 5 repeticiones, producto de la combinación de tres factores: 1) medios de cultivo (Murashige y Skoog-MS 0.5X y Woody Plant Medium-WPM), 2) hormonas (Thidiazuron-TDZ, Zeatina-ZEA y Trans-Zeatina-TZR y 3) dosis alta (TDZ 3 ppm, ZEA y TZR 4 ppm) y baja (TDZ 1.5 ppm, ZEA y TZR 2 ppm). Se sembraron cuatro hojas en una caja petri (5cm) incubadas en humedad relativa controladas y dos fotoperíodos (8h oscuridad / 16h luz y 24h oscuridad). Las variables consideradas fueron oxidación, muerte de los explantes, presencia o ausencia de callos y porcentaje de formación de callos. La evaluación fue cada 10 días por un período de 60 días.

De los resultados se desprende que el mejor medio para producción de callos fue WPM ya que hubo menor oxidación y muerte de los explantes. La hormona que mayor porcentaje de callos presentó fue con TDZ en dosis altas. Del estudio se puede inferir que la callogénesis es una alternativa viable para la propagación *in vitro* de mortiño. Sin embargo, el éxito va a depender de la dosis de hormonas, el medio de cultivo, fotoperiodo y, finalmente el genotipo del material.

Palabras clave: Callogénesis, *Vaccinium floribundum*, Zeatina, Trans-Zeatina, Thidiazuron, Woody Plant Medium.

ABSTRACT

Andean berry or mortiño (*Vaccinium floribundum*) is a wild berry that grows in the Ecuadorian moors above 3400 masl, it has natural antioxidants and highly valued for its taste, medicinal and nutritional properties. At present, there are no domesticated crops or efficient propagation methods to produce plants, due to the limitations for their establishment. In the present study, an alternative was established for mortiño micropropagation, for this, the response of plant material to callogenesis was evaluated, in different media, with the use of growth regulators in different concentrations, and submitted to different photoperiods.

The induction of calluses of mortiño was carried out evaluating 12 treatments with 5 repetitions, product of the combination of three factors: 1) culture media (Murashige and Skoog-MS 0.5X and Woody Plant Medium-WPM), 2) hormones (Thidiazuron- TDZ, Zeatina-ZEA and Trans-Zeatina-TZR and 3) high dose (TDZ 3 ppm, ZEA and TZR 4 ppm) and low dose (TDZ 1.5 ppm, ZEA and TZR 2 ppm). Four leaves were planted in a petri dish (5cm) incubated in controlled relative humidity and two photoperiods (8h dark / 16h light and 24h dark). The variables considered were oxidation, death of the explants, presence or absence of calluses and percentage of callus formation. The evaluation was every 10 days for a period of 60 days.

From the results the best means for callus production was WPM since there was less oxidation and death of the explants. The hormone with the highest percentage of calluses was with TDZ in high doses. From the study it can be inferred that the callogenesis is a viable alternative for the in vitro propagation of mortiño. However, success will depend on the dose of hormones, the culture medium, photoperiod and, finally, the genotype of the material.

Key words: Callus culture, *Vaccinium floribundum*, Zeatin, Trans-Zeatin, Thidiazuron, Woody Plant Medium.

ÍNDICE

1 CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema.....	2
1.3 Justificación	3
1.4 Objetivos	3
1.4.1 Objetivo General	3
1.4.2 Objetivos Específicos	3
2 CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Generalidades del mortiño.....	4
2.1.1 Situación actual	5
2.1.2 Descripción Botánica.....	5
2.1.2.1 Estructura de la flor.....	6
2.1.2.2 El fruto	7
2.1.2.3 Semillas	8
2.1.3 Composición Química y Nutricional.....	9
2.1.4 Compuestos antioxidantes	9
2.1.5 Domesticación de cultivos	10
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	10
2.2.1 Generalidades	10
2.2.2 Organogénesis	11
2.2.3 Condiciones de cultivo	12
2.2.4 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Vaccinium</i>	13
2.2.4.1 Regeneración de plántulas a partir de explantes.....	15
2.2.5 Callogénesis.....	15
2.3 Medios de cultivo	16
2.3.1 Murashige & Skoog (MS)	16
2.3.2 Woody Plant Medium (WPM)	17
2.4 Reguladores de crecimiento.....	18
2.4.1 Promotores de crecimiento	18
2.4.1.1 Auxinas.....	19

2.4.1.2 Giberelinas.....	19
2.4.1.3 Citoquininas.....	20
2.4.1.3.1 ZEA, TRZ.....	20
2.4.1.3.2 TDZ.....	22
2.4.2 Inhibidores de crecimiento	23
2.4.2.1 Ácido Abscísico (ABA).....	23
2.4.2.2 Etileno.....	23
2.5 Agentes gelificantes	23
3 CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL.....	24
3.1 Factores en estudio	24
3.2 Tratamientos	24
3.3 Variables	25
3.4 Diagrama de flujo del proceso	25
4 CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS.....	26
4.1 Población y muestra	26
4.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos	26
4.2.1 Preparación de medios de cultivo	26
4.2.2 Siembra de explantes para callogénesis.....	27
4.3 Evaluación estadística de los resultados.....	29
5 CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
5.1 Oxidación de las hojas.....	29
5.1.1 Fotoperíodo 1 (8 h luz/16 h oscuridad).....	30
5.1.2 Fotoperíodo 2 (24 h oscuridad)	35
5.1.3 Fotoperíodo 1 vs. Fotoperíodo 2	40
5.1.4 Número de explantes muertos	43
5.1.4.1 Número de explantes muertos en Fotoperíodo 1.....	43
5.1.4.2 Número de explantes muertos en Fotoperíodo 2.....	46
5.1.5 Presencia de callos	53
5.1.6 Porcentaje de formación de callo	55
6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
6.1 Conclusiones.....	59

6.2 Recomendaciones	59
REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Componentes químicos y nutricionales del fruto de mortiño.	9
Tabla 2 Principales antioxidantes del fruto de mortiño.	10
Tabla 3 Componentes MS.....	17
Tabla 4 Elementos del medio Woody Plant.....	18
Tabla 5 Tratamientos de inducción de callos de mortiño.	25
Tabla 6 Análisis de Varianza del número de hojas oxidadas, evaluadas con diferentes medios de cultivo, hormonas y dosis en 6 períodos de tiempo, con fotoperíodo 16/8h luz.....	31
Tabla 7 Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, evaluadas en 2 medios de cultivo, a los 20 y 30 días de siembra de los explantes, 2018.	32
Tabla 8 Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño del factor 3 (dosis altas y bajas), evaluadas a los 10 días de siembra, 2018.....	32
Tabla 9 Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, de las interacciones de los factores 1 y 2 (M x H), a los 10 y 20 días de siembra, 2018.	33
Tabla 10 Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, de las interacciones de los factores 1 y 3 (M x D), 20 días de siembra, 2018.	34
Tabla 11 Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, de las interacciones de los 3 factores (M x H x D) a los 20 días de siembra, 2018. ...	34
Tabla 12 Análisis de Varianza del número de hojas oxidadas, evaluadas con diferentes medios de cultivo, hormonas y dosis en 6 períodos de tiempo con 24h oscuridad, 2018.	36
Tabla 13 Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, evaluadas con 3 hormonas (TDZ, ZEA, TZR), medidos desde los 10 días hasta los 60 días de siembra, tratamiento con oscuridad, 2018.....	37
Tabla 14. Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, de la interacción MxH a los 30 y 60 días de siembra, 2018.....	37
Tabla 15. Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, de la interacción Medio x Hormona a los 30 y 60 días de siembra, 2018.	38
Tabla 16. Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, de la interacción MxHxD a los 30 días de siembra, 2018.	38

Tabla 17 Análisis de Varianza del número de hojas muertas, evaluadas con diferentes medios de cultivo, hormonas y dosis en 6 períodos de tiempo con 8 h luz y 16 h oscuridad, 2018.	44
Tabla 18 Promedios de hojas muertas de mortíño, evaluadas en 2 medios de cultivo, sembradas con 8 h luz y 16 h oscuridad a los 50 y 60 días de siembra de los explantes, 2018.....	45
Tabla 19 Promedios de hojas muertas de mortíño, evaluados con 3 hormonas 50 días de siembra, 2018.	45
Tabla 20 Análisis de Varianza del número de hojas muertas, evaluadas con diferentes medios de cultivo, hormonas y dosis en 6 períodos de tiempo con fotoperíodo (24 h oscuridad), 2018.	47
Tabla 21 Promedios de hojas muertas de mortíño, evaluados con 3 hormonas en oscuridad, a los 50 días de siembra, 2018.	48
Tabla 22 Promedios del número de hojas muertas para la interacción M x H, evaluados a los 30, 40, 50 y 60 días en oscuridad, 2018.	48
Tabla 23 Promedios del número de hojas muertas para la Interacción MxD, evaluada a los 40 días de siembra, en oscuridad, 2018.	49
Tabla 24 Promedio del número de hojas muertas para la Interacción HxD, evaluada a los 40 días de siembra en oscuridad, 2018.....	49
Tabla 25 Promedio del número de hojas muertas para la interacción MxHxD, evaluad a los 40 días de siembra en oscuridad, 2018.....	50
Tabla 26 Porcentaje de presencia de callos de explantes de mortíño dos fotoperíodo, 2018.	53
Tabla 27 ANOVA de la formación de callos a los 60 días, en fotoperíodo y en oscuridad.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth)	4
Figura 2. Estructura de la planta de mortiño.....	6
Figura 3. Inflorescencia (A), morfología de flor (B) y grano de polen (C) de <i>Vaccinium floribundum</i>	7
Figura 4. Fruto del mortiño	8
Figura 5. Semilla de mortiño.....	8
Figura 6. Esquema de la organogénesis.....	12
Figura 7. Callo organogénico desarrollado en cultivo in vitro	15
Figura 8. Estructura de las principales auxinas.....	19
Figura 9. Estructura Química de la Kinetina.....	21
Figura 10: Estructura química de la ZEA y TZR.....	21
Figura 11. Estructura Química del Thidiazurón.....	22
Figura 12. Diagrama de flujo del presente estudio.....	26
Figura 13. Unidad experimental en estudio.....	27
Figura 14. Tratamientos en fotoperíodo (8h luz/16h oscuridad).....	28
Figura 15. Tratamientos en oscuridad.....	29
Figura 16. Fotografía de la oxidación de explantes en MS vs. WPM	35
Figura 17. Fotografía del tratamiento 1.2: a) hoja oxidada; b) hoja muerta; c) hoja oxidada con brote y d) hoja con callo	40
Figura 18. Promedio de la oxidación de hojas de mortiño en 6 períodos de tiempo, evaluados cada 10 días, con fotoperíodo 1	40
Figura 19. Promedio de la oxidación de hojas de mortiño en 6 períodos de tiempo, evaluados cada 10 días, con fotoperíodo 2	41
Figura 20. Fotografía tratamiento 8.2 luz (izquierda) y oscuridad (derecha). ...	42
Figura 21. Comparación del número de hojas muertas en MS vs. WPM	51
Figura 22. Número de hojas muertas en oscuridad MS (arriba) vs. WPM (abajo)	52
Figura 23. Callo en formación	54
Figura 24. Callo organogénico formado en la superficie de la hoja.....	55
Figura 25. Tratamiento WPM + TDZ + 3 mg l ⁻¹	58

1 CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El género *Vaccinium*, pertenece a la familia de las Ericáceas, el cual está conformado por aproximadamente 450 especies distribuidas en América del Norte, Centroamérica, la cordillera de los Andes y África (Angulo et al., 2015; Sanjinés et al., 2006). En el Ecuador, se han reportado tres especies: *V. distichum*, *V. crenatum*, y *V. floribundum*, siendo la última, la especie más común (Fernández et al., 2015). *Vaccinium floribundum* Kunth, conocido también como arándano andino o mortiño, es un fruto nativo de los páramos ecuatorianos (Coba et al., 2012), que crece de forma silvestre en zonas húmedas, templadas y páramos, con temperaturas que van desde los 8 a los 20°C. Se distribuye a lo largo de la cordillera en elevaciones desde los 3400 hasta los 3800 msnm (Vasco et al., 2010), desde la provincia del Carchi hasta Loja (Coba et al., 2012).

Es un arbusto ramificado que puede llegar a medir hasta los 3.5 m de altura, posee hojas pequeñas con el borde aserrado, florescencia en racimo, y el fruto es una baya de 5 a 8 mm de diámetro de color azul oscuro cuando ya está maduro (Sanjinés et al., 2006). Tradicionalmente se consume como fruta fresca, en mermeladas, bebidas, postres, y es el ingrediente principal de la bebida tradicional popular del Día de los Difuntos conocida como Colada Morada (Luteyn, 2002). Una baya de mortiño fresco aporta con 80% de agua, 0.7% de proteína, 1% de grasa, 16.9% de carbohidratos totales, 18.1% de ceniza, 0.4% de fibra, con un componente calórico de 84 Kcal g⁻¹ (Vasco et al., 2010). Cabe mencionar que una característica nutricional relevante de esta fruta es que presenta un alto contenido de minerales como Fe, Cu, Zn, Ca, Mg, K, Vitaminas A, B2, B3, C, β-carotenos, antocianinas, compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes (Llvisaca et al., 2018; Coba et al., 2012).

Las comunidades locales del Ecuador, tradicionalmente han consumido esta fruta para tratar afecciones médicas como la diabetes e inflamación

(Schreckinger et al., 2010), por lo que es considerado un alimento nutracéutico (Coba et al., 2012), a pesar de que contenga propiedades medicinales importantes y alto contenido nutricional, no se han logrado establecer cultivos, y los frutos que se venden en los mercados locales provienen de cultivos silvestres (Torres et al., 2010), por lo que es una planta que no ha sido domesticada (Magnitskiy et al., 2011).

Para contribuir en la conservación de este valioso recurso biológico, una alternativa es la micropropagación (Cobo et al., 2018). Estudios previos en especies del género *Vaccinium*, indican que se ha logrado establecer plantas *in vitro* a partir de brotes de yemas axilares, pero no se ha logrado aclimatar (Torres et al., 2010). La Universidad de Las Américas (UDLA), con la participación del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea la Mayora (IHSM), vienen ejecutando el proyecto “Potenciación del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt) en Ecuador: compuestos funcionales, fenología y producción *in vitro* de plantas a partir de semilla y se han establecido plantas *in vitro* para micropropagación (Dueñas, 2017; Recto, 2018).

1.2 Planteamiento del problema

El principal factor que limita el cultivo de mortiño es la falta de un sistema de propagación *in vitro* específico para *Vaccinium floribundum* (Cobo et al., 2018). Las especies leñosas silvestres presentan ciertos problemas para la micropropagación como baja respuesta morfogénica, esto se debe a que las plantas tienen una dinámica de crecimiento estacional, el cual está determinado por brotes aéreos. Además, son unas de las especies más recalcitrantes, dando como resultado que los brotes no se puedan generar fácilmente. Por otro lado, los altos índices de contaminación producidos al introducir material silvestre a condiciones *in vitro*, hace que se dificulte su establecimiento. Otro punto a tomar en cuenta es que a pesar de que los frutos contengan un alto número de semillas, muchas de las mismas no son viables, con tasas bajas de germinación en estado silvestre (Magnitskiy et al., 2011). De

modo que, esta especie vegetal ha sido poco estudiada y existe escasa información sobre su sistema de reproducción para *Vaccinium floribundum*.

1.3 Justificación

El aumento de la demanda de productos alimenticios con alto valor nutritivo ha convertido al mortiño en un fruto muy cotizado, debido a su sabor, propiedades nutricionales y medicinales, siendo componente ideal para dietas por su bajo contenido calórico y alto contenido de antioxidantes y fibra. Por otra parte, no existen protocolos de micropropagación para *Vaccinium floribundum*, debido a los inconvenientes para su establecimiento y a la escasa investigación que se ha venido realizando en los últimos años. Hasta la fecha se han reportado algunos estudios, donde han intentado establecer metodologías para la micropropagación de mortiño, sin embargo, los resultados no han sido satisfactorios y no se ha encontrado una tecnología eficiente para la producción y escalamiento de *in vitro* plantas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Evaluar la callogénesis como alternativa tecnológica de propagación *in vitro* del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la respuesta del mortiño a la inducción de callos en dos medios de cultivo.
- Evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento en la formación de callos a partir de tejido vegetal de *in vitro* plantas obtenidas de semilla.
- Determinar el efecto del regulador de crecimiento y la dosis para la inducción de callos y la obtención de brotes.

2 CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades del mortiño

El mortiño, como se muestra en la Figura 1, también llamado arándano andino o uva de monte, es una planta leñosa, silvestre y nativa de los páramos ecuatorianos. Se distribuye a lo largo de los Andes ecuatorianos, en elevaciones desde los 3400 hasta los 3800 msnm, en climas fríos y templados en temperaturas que van desde los 8 a los 18°C (Vasco et al., 2009). Se lo puede encontrar desde los páramos secos de El Ángel en la provincia del Carchi, hasta el Tambo, en la provincia de Cañar (Coba et al., 2012).

Pertenece a la familia Ericaceae y forma parte del género *Vaccinium* spp. (Sanjinés et al., 2006), el cual tiene alrededor de 450 especies. En el Ecuador se han identificado tres especies de mortiño: *V. distichum*, *V. crenatum*, distribuidas en la región sur del Ecuador, específicamente en las provincias de Azuay y Loja, y *V. floribundum* Kunth, la especie más abundante y localizada a lo largo del callejón interandino (Fernández et al., 2015).



Figura 1. Planta de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

Tomado de: Franz, 2017

2.1.1 Situación actual

En la actualidad no se conocen cultivos comerciales de mortiño, aunque la demanda se ha ido incrementando en los últimos años, existe poca oferta.

La explotación y cosecha de este fruto se fundamenta en plantas silvestres, sin embargo, cada vez el hábitat natural de esta especie se ha visto amenazado por varios factores como la deforestación, incendios forestales, introducción de especies, es por esta razón, que se ha visto la necesidad de domesticar esta especie vegetal.

Los páramos andinos han sido afectados en la última década a causa del hombre, por medio de actividades relacionadas al pastoreo, específicamente con la introducción de ganado, el cual consume la vegetación del páramo, alterando completamente el hábitat (Coba et al., 2012). Según Mena et al., (2011), el mayor impacto ocasionado en los páramos es por la agricultura, ganadería y los incendios forestales. Cerca del 60% de los páramos están siendo invadidos, es decir, alrededor de veinte mil kilómetros cuadrados se están transformando en monocultivos y un 30% se quemaron debido a incendios ocasionados o accidentales. Quedando únicamente el 10% de páramos (Mena et al., 2011).

En general, los páramos ecuatorianos han sido afectados por diferentes factores, ocasionando que su ubicación se haya restringido a determinadas zonas y en específicas alturas, por consiguiente se ha perdido variabilidad genética, lo que produce erosión genética (Racines, 2016).

2.1.2 Descripción Botánica

Es un arbusto ramificado que puede medir desde 0.2 hasta los 3.5 m de altura, posee hojas pequeñas con el borde aserrado, si mismo, sus nervaduras son pinnadas, con flores pequeñas de hasta 1 cm, como se aprecia en la Figura 2.



Figura 2. Estructura de la planta de mortiño.

Tomado de: Hoskovec, 2017

2.1.2.1 Estructura de la flor

Las flores se encuentran agrupadas en forma de racimo, aunque también se presentan en solitario; pueden medir alrededor de 7 ± 0.5 mm de largo, tienen un pedicelo glabro, con un cáliz tubular, el cual puede ser articulado o no, con muchos sépalos y lóbulos de color verde, adicionalmente contiene un hipanto cilíndrico en forma de globo, el cual puede alojar aproximadamente 5 lóbulos lanceolados, por otro lado, su corola urceolada puede ser de color blanco o rosado, con 5 lóbulos, presenta de 8 a 10 estambres en el tubo de la corola, tiene anteras con tubos cortos (ver Figura 3b), además su dehiscencia apical provoca que su ovario sea ínfero, como se observa en la Figura 3c. Finalmente, el estilo es ligeramente más largo que la corola. Generalmente las flores están orientadas hacia un mismo lado, como se observa en la Figura 3a, sin embargo, cuando se forma el fruto sufren torsión, una característica relevante de esta especie vegetal es su alta floración (Chaparro *et al.*, 1999; Luteyn, 2002).

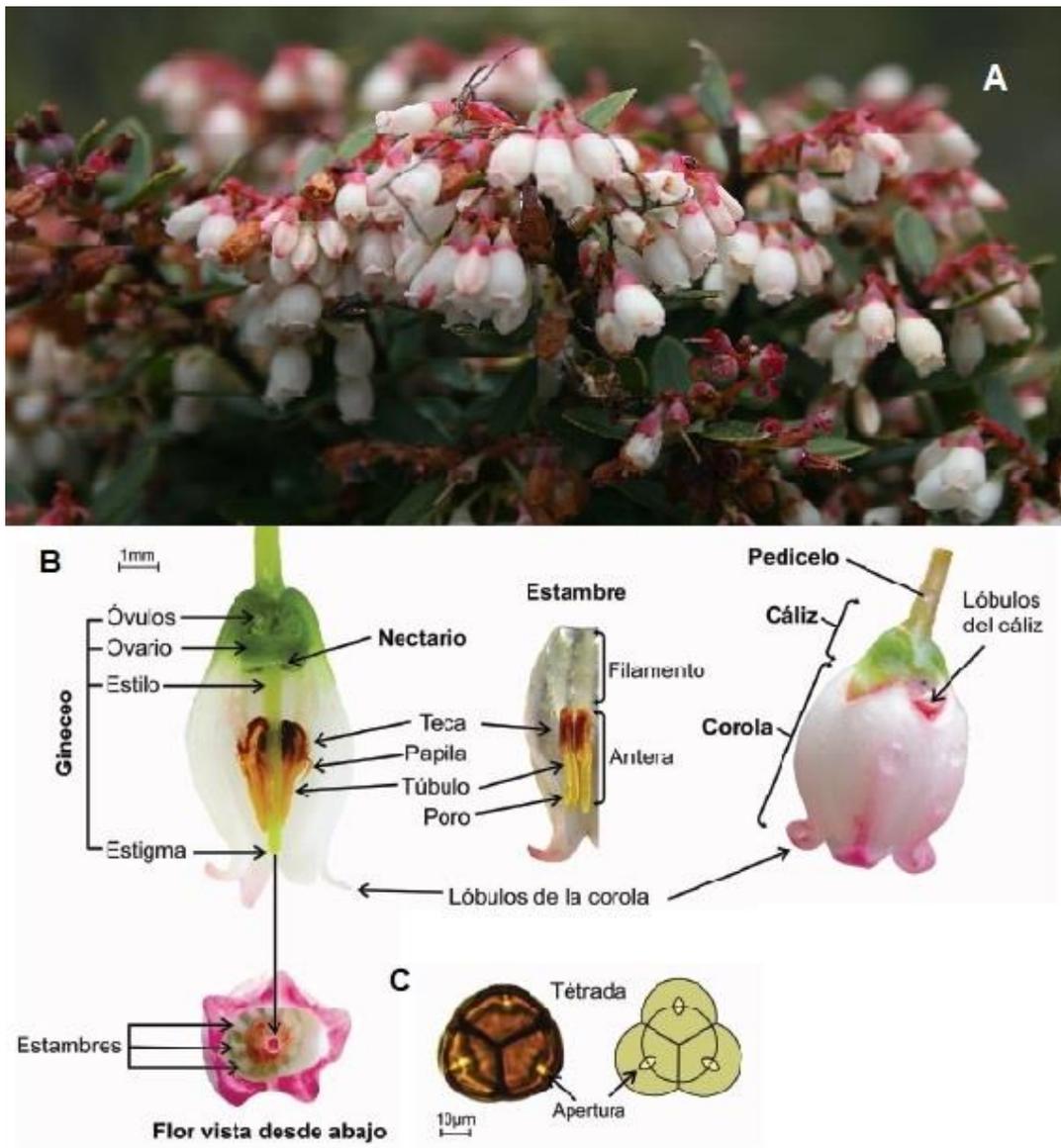


Figura 3. Inflorescencia (A), morfología de flor (B) y grano de polen (C) de *Vaccinium floribundum*.

Adaptado de: Chaparro et al., 1999; Hoskovec, 2017

2.1.2.2 El fruto

El fruto es una baya de forma esférica, como se aprecia en la Figura 4. Su endocarpio es carnoso y envuelve a la semilla, el cual proviene de un ovario ínfero, el mismo que se encuentra por debajo de los verticilos en un receptáculo cóncavo. Además, presenta cuatro carpelos, divididos en cuatro

septos. Los frutos inmaduros son de color verde, pero cuando alcanzan el grado de madurez se tornan de color morado oscuro a negro, lo que evidencia una alta concentración de antocianinas, las cuales tienen capacidades antioxidantes (Chaparro et al., 1999; Coba et al., 2012).



Figura 4. Fruto del mortiño

Tomado de: Vasco, 2009

2.1.2.3 Semillas

El mortiño tiene un alto número de semillas con respecto a su tamaño, número que varía entre 20 a 30 por baya. Tiene una longitud entre 0.9 a 1.2 mm de largo y 0.5 a 0.84 mm de ancho en estado seco, son de testa dura, de color pardo y de forma elíptica u ovoide, como se observa en la Figura 5 (Chaparro et al., 1999).

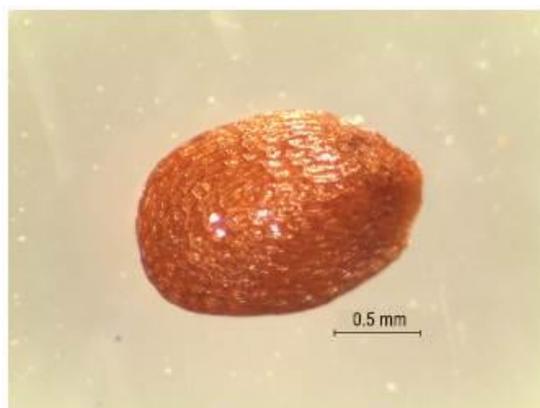


Figura 5. Semilla de mortiño.

Tomado de: La Rosa et al., 2017

2.1.3 Composición Química y Nutricional

Toda la información química y nutricional se aprecia en la Tabla 1:

Tabla 1

Componentes químicos y nutricionales del fruto de mortiño.

Componente	Nivel
Componentes aproximados	(g/100 g)
Humedad	81.0±2.0
Grasa	1.0±0.04
Proteína	0.7±0.02
Ceniza	0.4±0.03
Carbohidratos totales	16.9±0.1
Fibra total	7.6±2.2
• Fibra soluble	1.2±1.0
• Fibra insoluble	6.5±2.5
Azúcares solubles	(g/100 g)
Fructosa	4.4±0.4
Glucosa	2.6±0.3
Calorías	(kcal/100 g)
	84±0.4
Ácidos orgánicos	(mg/100 g)
Ácido cítrico	3142±614
Ácido málico	1823±274
Iones metálicos	(mg/100 g)
Hierro (Fe)	0.64±0.2
Potasio (K)	607±73
Calcio (Ca)	17±2.3
Magnesio (Mg)	10.2±1.1
Cobre (Cu)	0.12±0.02
Zinc (Zn)	0.13±0.02

Adaptado de: Vasco *et al.*, 2009

2.1.4 Compuestos antioxidantes

En el mortiño predomina el color negro azulado, lo que favorece la presencia de altas concentraciones de antocianinas, como se aprecia en la Tabla 2. Se ha reportado también la presencia de compuestos polifenólicos como ácido gálico, derivados del ácido vanílico, ácido hidroxibenzóico, quercetina, derivados del ácido clorogénico (Prencipe *et al.*, 2014; Vasco *et al.*, 2009).

Tabla 2
Principales antioxidantes del fruto de mortiño.

Principales antioxidantes	Concentración (mg/100 g)
Ácido ascórbico	9±2
β-caroteno	0.036±0.006
Ácido gálico	3.1±1.9
Ácido vanílico	5±1.9
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	2.1±0.9
(+)-Catequina	10±3
(-)-epicatequina	8±4.1
Quercetina	35±11
Myricetina	2.6±1
Ácido clorogénico	17±10
Ácido caféico	15±8
Ácido <i>p</i> -cumárico	1.7±1.2
Cianidina	203±47
Agliconas totales	303

Tomado de: Coba et al., 2012; Vasco et al., 2009

2.1.5 Domesticación de cultivos

La domesticación de cultivos es uno de los sucesos evolutivos más importantes de la civilización humana. La palabra domesticación deriva del latín *domus* “hogar” y se refiere a la acción de traer una especie silvestre cerca del lugar de hábitat del ser humano, específicamente a un cultivo, parcela o jardín (Diamond, 2002). Tradicionalmente, el proceso de domesticación ha sido considerado un proceso evolutivo “unidireccional”, donde las poblaciones silvestres responden a una acción ejercida por el hombre de selección artificial con cambios genéticos. También es considerada un proceso complejo de codependencia entre la planta y el hombre, que tiene su origen en una interacción cercana entre éstos y concluye con una mutua interdependencia (Fuller, 2007).

2.2 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

2.2.1 Generalidades

El cultivo de tejidos es definido como un conjunto de técnicas heterogéneas, que tienen como fundamento en que un explante o porción de una planta se

cultive de forma aséptica en un medio de cultivo artificial de composición definida y se incuba en condiciones controladas de temperatura, humedad y luz (Mroginski et al., 2010).

Dentro del cultivo de tejidos vegetales se encuentra la morfogénesis, la cual se define como la formación de órganos (raíces, hojas, yemas, entre otros), y comprende en la diferenciación y crecimiento celular. El proceso morfogenético en cultivos *in vitro* puede inducirse ya que las células vegetales poseen plasticidad celular, conocida como totipotencia (Doménech, 2012). La respuesta morfogenética sigue dos rutas alternativas: la organogénesis y la embriogénesis. En la primera se produce la formación de estructuras vegetales como tallos, raíces, hojas, entre otras y en la segunda, como su nombre lo indica, se forman embriones, que al germinar originan una nueva planta. Si la respuesta al estímulo es la formación de un brote sin pasar por etapa de callo (Kumari et al., 2017).

2.2.2 Organogénesis

La organogénesis hace referencia a la capacidad de las células vegetales para reprogramar su desarrollo y formación de órganos y tejidos nuevos (Doménech, 2012). Para que la organogénesis se lleve a cabo, es necesario que las células susceptibles a la reprogramación sean competentes, es decir, que cumplan con procesos de diferenciación celular (Taiz et al., 2006), que permitirán el desarrollo de una planta completa.

Durante este proceso de división celular activa, la mitosis es fundamental, ya que darán como resultado estructuras denominadas meristemoides, las cuales contienen un citoplasma denso; varios organelos; son de forma isodiamétrica, además, posee vacuolas pequeñas que contienen grandes reservas de almidón, las cuales van a ser fundamentales en el proceso de diferenciación (Thorpe, 2007). Durante el proceso de organogénesis la respuesta del explante va ser influenciada por la dosis y exposición de citoquininas y auxinas dentro del medio de cultivo (Smith, 2013).

La organogénesis se clasifica en dos tipos: la organogénesis directa y la indirecta. La diferencia de estas dos erradica en que en la directa se da el proceso de diferenciación celular, formando tejidos como hojas, tallos, entre otros; mientras que en la segunda, se da la formación de estructuras asimétricas denominadas callo, como se puede evidenciar en la Figura 6 (Smith, 2013).

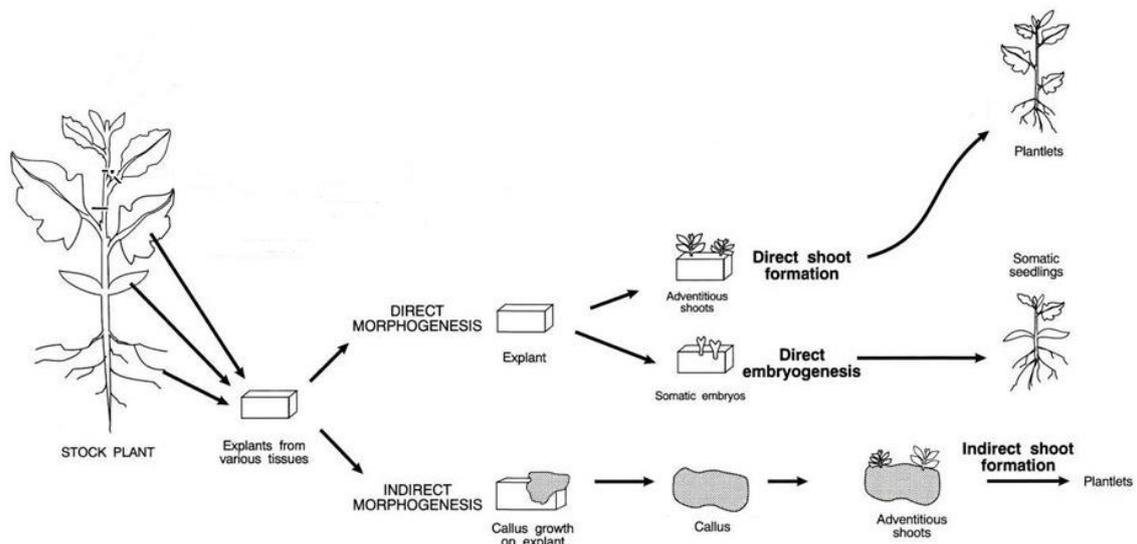


Figura 6. Esquema de la organogénesis

Tomado de: Smith, 2013

2.2.3 Condiciones de cultivo

La incubación de los cultivos se lleva a cabo en condiciones controladas de temperatura, humedad relativa, intensidad de luz (fotoperíodo) y la más importante, en condiciones de total asepsia. Estas condiciones se logran con el uso de cámaras especializadas que son climatizadas con aire acondicionado o calefacción, dependiendo del requerimiento del tejido vegetal y que tengan una buena circulación de aire (Mroginski et al., 2010). Por lo general las condiciones empleadas son: temperatura constante (22-25°C), fotoperíodo con ciclo luz/oscuridad de 16/8 horas y humedad elevada (40-80%).

2.2.4 Cultivo *in vitro* de *Vaccinium*

Se ha reportado que el cultivo *in vitro* de especies leñosas presenta ciertas dificultades con respecto a especies herbáceas, un factor que influye en el cultivo de tejidos es la edad del explante, siendo ideal explantes en estadio juvenil (Cobo et al., 2018). A su vez, los autores mencionados, indican que algunas especies leñosas son recalcitrantes. La recalcitración *in vitro* es la incapacidad de las células, tejidos y órganos de las plantas para responder a manipulaciones de cultivo de tejidos y es un factor limitante para la explotación biotecnológica de especies, además, afecta a la aplicación más amplia de técnicas de conservación *in vitro* (Benson, 2000).

Otros factores que influyen son: el tipo de tejido, el genotipo de la planta y la época del año de obtención del explante. Las especies leñosas tienden a ser sensibles a ciertas sales en altas concentraciones, por esta razón en 1980 Lloyd y McCrown formulan el medio de cultivo llamado Woody Plant Medium (WPM), el cual contiene bajas concentraciones de sales minerales (Lloyd & McCrown, 1980).

Para la propagación de especies del género *Vaccinium* se utiliza WPM con ciertas modificaciones (Debnath, 2007a). A su vez, Tetsumura et al., (2008) concluyeron que después de algunos subcultivos, las plantas cultivadas en este medio empezaron a tornarse rojas, lo que se presume ocurrió por déficit de algún micronutriente, por otro lado, en el medio Murashige & Skoog, (MS), el cultivo se tornó de aspecto vidrioso, por exceso de algún ion. Se realizó una combinación de ambos y obtuvieron buenos resultados.

Según Debnath & McRae, 2005 indican que la fuente de carbono ideal para especies del género *Vaccinium* es la sucrosa en concentraciones de 20 g L⁻¹. Por otro lado, el pH sugerido por Ostrolucká et al. (2004) para establecimiento de cultivos de *Vaccinium* spp. está entre 5.7 a 5.9, en donde concluyen que este género de plantas leñosas son afines a pH's ligeramente ácidos.

Los reguladores de crecimiento más utilizados en varios protocolos son la zeatina (ZEA) y la 6-gama, gama-dimetil amino purina (2-iP). Debnath & McRae, 2005 en su protocolo de multiplicación y germinación de semillas utilizaron medios WPM enriquecidos con 2.5 y 5 mg L⁻¹ de zeatina y 2iP, respectivamente. Otros estudios de germinación y establecimiento de *Vaccinium*, probaron dos medios distintos: MS modificado con 5 mg L⁻¹ de 2iP, 0.1 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y 0.05 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA). Se reportó germinación de semillas en ambos medios, después de dos meses, sin embargo, no lograron un tamaño considerable, lo que se presume que no había crecimiento en ausencia de citoquininas por la influencia en la dominancia apical (Jaakola et al., 2001).

Existen varios protocolos de multiplicación de arándanos del género *Vaccinium*, pero ninguno llega a un consenso en cuanto a la dosis y la combinación de hormonas, ya que unos utilizan ZEA desde 0.2 hasta 4.4 mg L⁻¹, otros, 2iP desde 2.5 hasta 7.5 mg L⁻¹ (Castro et al., 2015; Debnath, 2007; Debnath & McRae, 2005; Tetsumura et al., 2008).

En los últimos años se han venido realizando estudios sobre propagación *in vitro* de especies de *Vaccinium*, donde se ha reportado que la eficiencia de esta técnica es influenciada por la interacción entre tipo de reguladores de crecimiento con el medio de cultivo utilizado. Adicionalmente, las plantas *in vitro* producidas con esta técnica tienen buena respuesta de crecimiento con respecto a métodos tradicionales (propagación por estacas) (Debnath, 2007a).

Otros estudios de inducción de callos y regeneración de explantes de *Vaccinium* (TingTing & ZhouPing, 2010) implementan un medio basal WPM, enriquecido con 3 mg L⁻¹ de Thidiazuron (TDZ) y 0.5 mg L⁻¹ de (ZEA), obteniendo una tasa de regeneración de brotes adventicios superior a 10.26 y formación de callos después de los 50 días. A su vez, Debnath (2005b, 2018); Novikova & Zaytseva, (2018) adicionaron TDZ para micropropagación de varias especies de *Vaccinium* para conseguir la elongación de raíces.

2.2.4.1 Regeneración de plántulas a partir de explantes

El término regeneración se define como la formación de órganos que no se encontraban en el explante inicial (Taiz et al., 2006), y se produce en tres etapas: diferenciación, inducción y desarrollo. En la diferenciación, las células toman dos caminos: la vía directa, en donde existe diferenciación celular; y la vía indirecta, donde hay formación de callo. En la segunda etapa, mediante un estímulo hormonal, las células se desarrollan. Finalmente en la última etapa, el órgano se empieza a desarrollar en presencia o ausencia de hormona (Taiz et al., 2006).

2.2.5 Callogénesis

Un callo consiste en una masa de células sin diferenciación, como se aprecia en la Figura 7. Por lo general son amorfos y son el resultado de una herida ocasionada en zonas meristemáticas (Doménech, 2012). Una característica relevante de un callo es que crece de manera irregular, es decir, no sigue un patrón o forma definida, sin embargo, tiene el potencial de desarrollar una planta completa (Debnath & McRae, 2005).

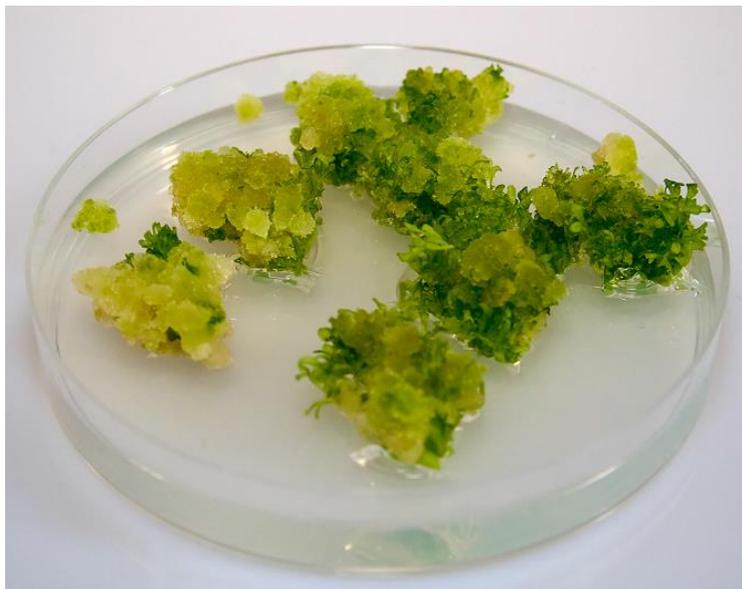


Figura 7. Callo organogénico desarrollado en cultivo in vitro

Tomado de: Jordán & Casaretto, 2006

2.3 Medios de cultivo

El componente principal de un cultivo *in vitro* es el medio, el mismo que simula los nutrientes que son necesarios para el desarrollo de la planta (Kumari *et al.*, 2017). Puede variar dependiendo de las necesidades, de la finalidad del cultivo y de la especie vegetal. Está compuesto mayoritariamente por agua (90-95%), nutrientes y un agente gelificante, que le convierte en un soporte para el crecimiento de la planta (Sujarwo *et al.*, 2016). El componente esencial del medio de cultivo es la fuente de carbono, donde se utilizan diferentes azúcares como sacarosa, fructosa, sucrosa, entre otras. Adicionalmente, se adicionan las sales minerales que son indispensables para el metabolismo de la planta, las mismas que se clasifican en: macronutrientes (N, P, K, S, Ca, Mg) y micronutrientes (Fe, Co, Cu, Zn) (Kumari *et al.*, 2017). Otros compuestos que se adicionan al medio de cultivo como un suplemento y producción de coenzimas son las vitaminas. Pueden ser de varios tipos y las cantidades de sus elementos varían de acuerdo al tipo de especie vegetal con la que se esté trabajando, sin embargo el tiempo de vida de estos elementos son limitados dada la degradación de los reguladores de crecimiento (Bhojwani & Dantu, 2013). Es recomendable que en etapas iniciales se utilice un medio de cultivo sólido pero a medida que el explante se desarrolla se puede implementar medios líquidos pero bajo control para evitar cuadros de hiperhidricidad (Rezali *et al.*, 2017).

2.3.1 Murashige & Skoog (MS)

Este medio de cultivo basal, como se muestra en la tabla 3, es uno de los más utilizados para la micropropagación de brotes (Murashige & Skoog, 1962) y a través de los años ha sufrido múltiples modificaciones para ser adecuado a distintos tipos de cultivos, en ocasiones la mitad de la concentración original es suficiente para el desarrollo de los explantes y en otras ha sido necesario adicionar vitaminas para satisfacer las necesidades del cultivo (Bhojwani & Dantu, 2013). Para el desarrollo adecuado se debe complementar el medio con

reguladores de crecimiento como citoquininas y auxinas dependiendo del tipo de respuesta que se espera obtener, una combinación adecuada favorecerá al crecimiento rápido de los brotes, en el caso de que la concentración de citoquininas sea más alta puede inducir callosidad (Rezali et al., 2017).

Tabla 3
Componentes MS

Macronutrientes	Nitrato de amonio (NH_4NO_3) Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Fosfato de potasio (KH_2PO_4) Nitrato de potasio (KNO_3)	1,650 mg L^{-1} 440 mg L^{-1} 370 mg L^{-1} 170 mg L^{-1} 1.90 g L^{-1}
Micronutrientes	Ácido bórico (H_3BO_3) Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) Yoduro de potasio (KI) Molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6.2 mg L^{-1} 0.025 mg L^{-1} 0.025 mg L^{-1} 27.8 mg L^{-1} 22.3 mg L^{-1} 0.83 mg L^{-1} 0.25 mg L^{-1} 8.6 mg L^{-1} 37.2 mg L^{-1}
Vitaminas	Inositol Niacina Piridoxina · HCl Tiamina · HCl Glicinas	100 mg L^{-1} 0.5 mg L^{-1} 0.5 mg L^{-1} 0.1 mg L^{-1} 2 mg L^{-1}

Tomado de: Himedia Plantigen, 2017

2.3.2 Woody Plant Medium (WPM)

Medio de cultivo desarrollado en 1981, utilizado especialmente para la propagación de plantas leñosas. Su formulación está basada en el conjunto de nutrientes inorgánicos, vitaminas, sales y aminoácidos (Himedia Plantigen, 2017). Cada uno de los macro y microelementos fueron definidos en ciertas cantidades como se observa en la Tabla 4 (Lloyd & McCown, 1980), jugando un rol fundamental en el metabolismo de la planta. Sin embargo, la modificación de estas puede ser definida por el investigador, siempre bajo el criterio de idoneidad para especies específicas.

Tabla 4
Elementos del medio Woody Plant.

Microelementos	mg L⁻¹	µM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.25	1.00
FeNa.EDTA	36.70	100.00
H ₃ BO ₃	6.20	100.27
MnSO ₄ .H ₂ O	22.30	131.94
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	1.03
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	29.91
Macroelementos	mg L⁻¹	mM
CaCl ₂	72.50	0.65
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	471.26	2.35
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25
K ₂ SO ₄	990.00	5.68
MgSO ₄	180.54	1.50
NH ₄ NO ₃	400.00	5.00

2.4 Reguladores de crecimiento

Son moléculas orgánicas que controlan procesos de desarrollo en las plantas, por lo que su respuesta va a depender de la especie vegetal, del área u órgano donde intervenga, de la concentración, de la interacciones con otros reguladores de crecimiento y de factores ambientales (Bhojwani & Dantu, 2013). Se clasifican de acuerdo con el modo de acción en dos grandes grupos: 1) Promotores e 2) Inhibidores.

2.4.1 Promotores de crecimiento

Como su nombre lo indica regula funciones como: estimular el crecimiento y formación de raíces, regulación de tropismos, desarrollo de flores y frutos, diferenciación vascular, abscisión de órganos, crecimiento y elongación celular, dominancia apical, división celular, retardan la senescencia en hojas (Taiz et al., 2006). Dentro de las fitohormonas que promueven una respuesta existen cuatro grupos principales de moléculas que son sintetizadas por la planta de manera natural y son:

2.4.1.1 Auxinas

Es un grupo de fitohormonas responsables de regular el crecimiento, entre ellos la diferenciación de raíces y la división celular. Además, cumplen un papel muy importante en los tropismos (geotropismo o fototropismo), intervienen en la dominancia apical y crecimiento de flores y frutos (Smith, 2013; Taiz et al., 2006). Las auxinas más importantes dentro del cultivo *in vitro*, al ser las más utilizadas son el ANA, ácido indol-3-acético (AIA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolbutírico (AIB), moléculas que se observan en la Figura 8.

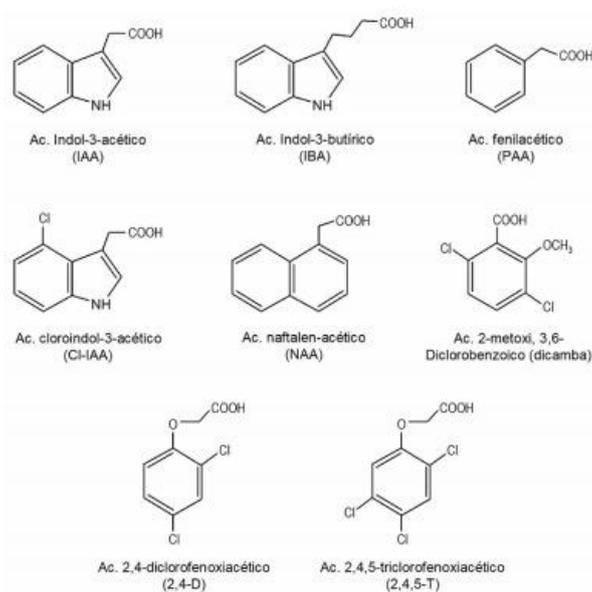


Figura 8. Estructura de las principales auxinas.

Tomado de: Jordán & Casaretto, 2006

2.4.1.2 Giberelinas

Las giberelinas, conocidas también como (GA_3), son parte de una familia de compuestos tetracíclicos diterpenoides, responsables de la regulación de procesos de crecimiento y desarrollo. Intervienen en la germinación de semillas; elongación y diferenciación de tallos; promueven el desarrollo del fruto y la floración (Smith, 2013).

2.4.1.3 Citoquininas

Son hormonas naturales de origen vegetal que promueven la división celular; el transporte de solutos hacia las hojas, mientras que en las semillas y frutos producen un retardo en la senescencia (Jordán & Casaretto, 2006). Las citoquininas más utilizadas son la Zeatina (ZEA), 2-iP, Thidiazuron (TDZ) y la Trans-Zeatina (TZR).

El uso de citoquininas en el medio de cultivo de varias especies vegetales induce a la formación de callos, permitiendo que regiones meristemáticas se diferencien en una masa celular homogénea (Taiz et al., 2006). Una proporción adecuada de citoquininas y auxinas permite controlar y regular la organogénesis, por lo que es importante establecer concentraciones de estas fitohormonas mediante diseños factoriales dependiendo de la especie vegetal y según el objetivo de la investigación. Dicho de otro modo, en altas concentraciones de auxinas y citoquininas, se da la formación brotes; cuando la relación es baja, se producen raíces y con relaciones 1:1, se da la formación de callos (Jordán & Casaretto, 2006).

2.4.1.3.1 ZEA, TRZ

Folke Skoog e investigadores de la Universidad de Wisconsin probaron algunas sustancias para iniciar y mantener la división de tejido de médula de tabaco cultivado. Habían observado que la adenina tenía un ligero efecto promotor, por lo que probaron la posibilidad de que los ácidos nucleicos estimularían la división en este tejido. Sorprendentemente, el ADN del esperma de arenque (*Clupea* sp.) autoclavado tuvo un poderoso efecto en la división celular (Murashige & Skoog, 1962).

Después de mucho trabajo, se identificó una pequeña molécula a partir del ADN autoclavado y se llamó **kinetina**, como indica la Figura 9. Se demostró que era un derivado de la 6-aminopurina (Taiz et al., 2006):

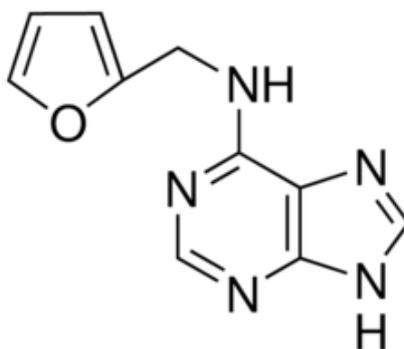


Figura 9. Estructura Química de la Kinetina.

Tomado de: Sigma-Aldrich, 2018

La kinetina no es de origen natural, y no se presenta como una base en el ADN de ninguna especie. Es un subproducto de la degradación del ADN inducida por el calor, en la que el azúcar desoxirribosa de la adenosina se convierte en un anillo de furfurilo y se desplaza de la posición 9 a la posición 6 en el anillo de adenina (Taiz et al., 2006).

Varios años después del descubrimiento de la kinetina, se encontró que los extractos del endospermo inmaduro del maíz (*Zea mays*) contenían una sustancia que tiene el mismo efecto biológico que la kinetina. Esta sustancia estimula las células de la planta madura para que se dividan cuando se agregan a un medio de cultivo junto con una auxina. Letham (1973) aisló la molécula responsable de esta actividad y la identificó como trans-6-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enilamino) purina, a la que llamó ZEA (Figura 10):

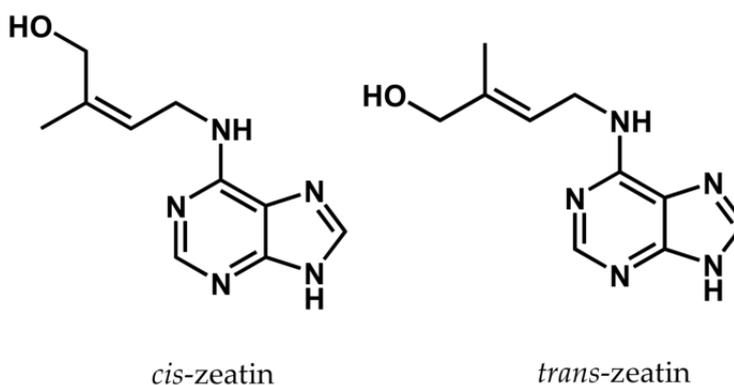


Figura 10: Estructura química de la ZEA y TZR.

Tomado de: Lu & Xu, 2015

La estructura molecular de la zeatina es similar a la de la quinetina. Ambas moléculas son adenina o derivados de aminopurina. Aunque tienen diferentes cadenas laterales, en ambos casos la misma está unida al nitrógeno de la aminopurina. Debido a que la cadena lateral de zeatin tiene un doble enlace, puede existir en la configuración cis o trans (Lu & Xu, 2015; Taiz et al., 2006).

En plantas superiores, la zeatina se produce tanto en la configuración cis como en la trans, y estas formas pueden ser interconvertidas por una enzima conocida como zeatina isomerasa. Aunque la forma trans de zeatina es mucho más activa en los ensayos biológicos, la forma cis también puede desempeñar funciones importantes como la dominancia apical y crecimiento primario. Recientemente, se ha clonado un gen que codifica una enzima glucosil transferasa específica de cis-zeatina, que además apoya un papel biológico para esta isoforma de zeatina (Taiz et al., 2006).

2.4.1.3.2 TDZ

En los últimos años, se ha sintetizado y probado muchos compuestos químicos que emulen la actividad de una citoquinina. Casi todos los compuestos activos como citoquininas son aminopurinas N6-sustituidas, y todas las citoquininas naturales son derivados de aminopurinas. También hay compuestos sintéticos que no se han identificado en las plantas, de los cuales los más notables son las citoquininas de tipo difenil-úrea, como el TDZ (Figura 11), que se usa comercialmente como defoliante y como herbicida (Taiz et al., 2006).

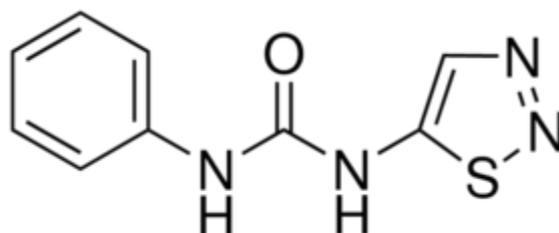


Figura 11. Estructura Química del Thidiazurón.

Tomado de: Sigma-Aldrich, 2018

2.4.2 Inhibidores de crecimiento

Son hormonas de origen vegetal cuya respuesta en la planta es de carácter inhibitorio, se clasifica en dos grupos principales:

2.4.2.1 Ácido Abscísico (ABA)

El ABA es un inhibidor del crecimiento natural de las plantas, que se produce cuando existe algún tipo de estrés ocasionado por falta de agua, salinidad del suelo, altas o bajas temperaturas, etc. El ABA ayuda a la planta a protegerse de estos factores, facilitando el cierre de estomas y producción de proteínas protectoras (Taiz et al., 2006).

2.4.2.2 Etileno

Es un compuesto químico en forma de gas, conocido como hormona de maduración, regula procesos fisiológicos de la planta como la senescencia de las hojas, germinación de semillas e induce a la floración. Se distribuye a lo largo de la planta por difusión y tiene la característica de ser pleiotrópico (Jordán & Casaretto, 2006).

2.5 Agentes gelificantes

Componente del medio de cultivo utilizado para brindar soporte al explante y evitar el contacto directo con los fitorreguladores. La concentración de este compuesto dependerá de la permeabilidad y velocidad de dispersión que el cultivo requiere, en general los medios sólidos son utilizados en la etapa de iniciación y multiplicación (Bhojwani & Dantu, 2013), para procesos posteriores se recomiendan medios líquidos. Son de varios tipos, pero el más utilizado es la agarosa, misma que ha incrementado su valor debido a su alta demanda y sus propiedades fisicoquímicas, abarcando el 70% del costo total del medio de cultivo, lo cual representa un problema económico (López-Escamilla et al.,

2016). Es así, que han empezado varias investigaciones para buscar alternativas y encontrar soluciones a este problema a través de sustitutos como almidones sintetizados por bacterias y almidones que representen menos costos de producción (Martin, Cárdenas, & Pacheco, 2012).

3 CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

En esta investigación se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2x3x2 con 5 repeticiones por cada tratamiento.

3.1 Factores en estudio

Se consideraron tres factores mismos que se detallan a continuación:

- **F1: Medio de cultivo (M)**

m1= MS 0.5X

m2= WPM

- **F2: Hormonas (H)**

h1 = TDZ

h2 = ZEA

h3 = TZR

- **F3: Dosis de las hormonas (D)**

d1= Alta (TDZ 3 mg L⁻¹; ZEA 4 mg L⁻¹; TZR 4 mg L⁻¹)

d2= Baja (TDZ 1.5 mg L⁻¹; ZEA 2 mg L⁻¹; TZR 2 mg L⁻¹)

3.2 Tratamientos

Los tratamientos para la inducción de callos de mortño se muestran en la Tabla 5. Se realizaron 5 repeticiones de cada tratamiento.

Tabla 5
Tratamientos de inducción de callos de mortiño.

Tratamiento	Código	Descripción
t1	m1h1d1	0.5 MS + TDZ + 3 mg L ⁻¹
t2	m1h1d2	0.5 MS + TDZ + 1.5 mg L ⁻¹
t3	m1h2d1	0.5 MS + ZEA + 4 mg L ⁻¹
t4	m1h2d2	0.5 MS + ZEA + 2 mg L ⁻¹
t5	m1h3d1	0.5 MS + TZR + 4 mg L ⁻¹
t6	m1h3d2	0.5 MS + TZR + 2 mg L ⁻¹
t7	m2h1d1	WPM + TDZ + 3 mg L ⁻¹
t8	m2h1d2	WPM + TDZ + 1.5 mg L ⁻¹
t9	m2h2d1	WPM + ZEA + 4 mg L ⁻¹
t10	m2h2d2	WPM + ZEA + 2 mg L ⁻¹
t11	m2h3d1	WPM + TZR + 4 mg L ⁻¹
t12	m2h3d2	WPM + TZR + 2 mg L ⁻¹

3.3 Variables

Número de explantes oxidados y muertos (n): El conteo de explantes oxidados (el color del callo fue pardo u oscuro) y muertos (callo con necrosis) fueron observados en un estereomicroscopio cada 10 días, hasta el día 60.

Formación de callo: La formación de callo se determinó mediante observación cada 10 días, hasta el día 60. Se consideró un callo en buen estado al que presentaba un crecimiento irregular y color verde o rojizo por la presencia de las antocianinas.

Crecimiento de callo formado: El crecimiento de callo formado se determinó mediante el incremento de volumen de los callos a los 60 días, según la escala propuesta por Santana en 1982. La escala asignada para el crecimiento de callos formados será: callo muerto, sin formación de callo, callo vivo sin crecimiento, callo con 25% de volumen desarrollado, callo con 50% de volumen desarrollado, callo con un 100% de volumen desarrollado.

3.4 Diagrama de flujo del proceso

A continuación, la Figura 13 muestra el diagrama de flujo del proceso general de inducción de callos de mortiño.

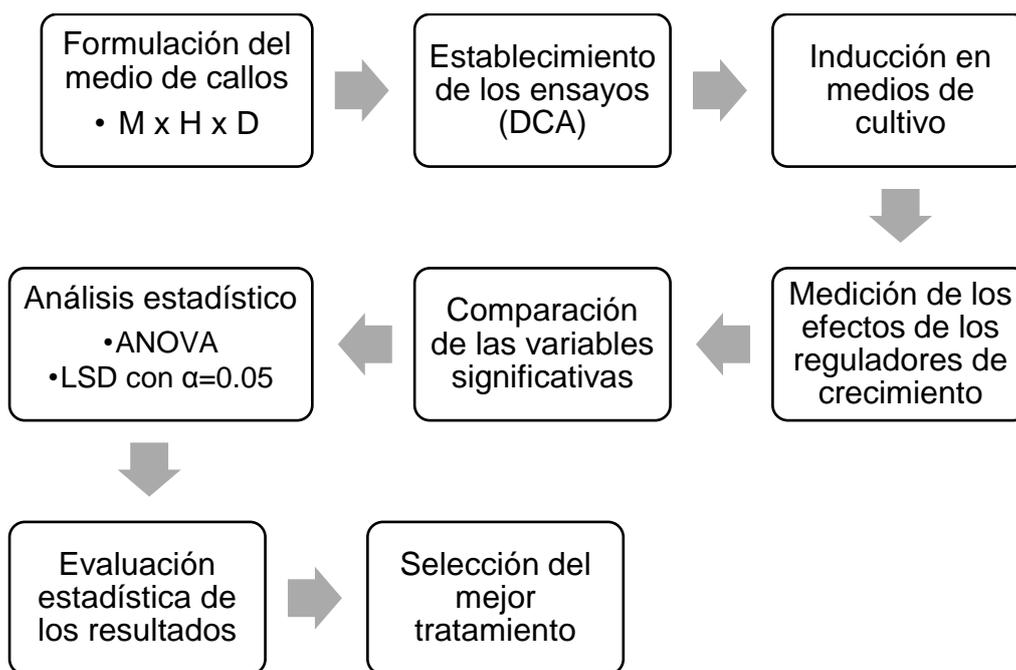


Figura 12. Diagrama de flujo del presente estudio

4 CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1 Población y muestra

Las muestras de *in vitro* plantas de mortiño donde se extrajeron las hojas para el establecimiento de los ensayos de callogénesis, fueron provenientes de semillas. Los ensayos experimentales se realizaron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina, INIAP, ubicado en la parroquia Cutuglagua, del cantón Mejía, en la provincia de Pichincha.

4.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos

4.2.1 Preparación de medios de cultivo

Para la formulación de los medios de cultivo, se realizaron los medios de cultivo que se especifican en la Tabla 4.

Según los protocolos establecidos por Debnath, 2005a, 2007b, 2018 en especies del género *Vaccinium*, implementan WPM a una concentración 1X. Por otro lado, Brenes *et al.*, (2015) y Cobo *et al.*, (2018), utilizan MS basal a una concentración de 0.5X. Tomando como referencia estos protocolos, se preparó 200 mL de medio de cultivo a una concentración de 2.2 g L⁻¹, los cuales fueron suplementados con TDZ (1.5 y 3 mg L⁻¹), ZEA y TZR (2 y 4 mg L⁻¹, respectivamente), además se añadió 30 g L⁻¹ de sucrosa y se ajustó el pH a 5.7. Finalmente, se agregó 6 g L⁻¹ de agar. Se autoclavaron en matraces a una temperatura de 121°C durante 15 minutos a 20 psi de presión. Posteriormente, se dispensaron aproximadamente 10 mL de medio en cajas Petri de 5 cm de diámetro en una cámara de flujo laminar vertical y fueron etiquetados de acuerdo con la nomenclatura correspondiente.

4.2.2 Siembra de explantes para callogénesis

En la cámara de flujo laminar y con el instrumental esterilizado se retiraron las *in vitro* plantas provenientes de semillas, se aisló el tejido foliar y se colocaron 4 explantes por caja en medios de cultivo con las hormonas y dosis en estudio (unidad experimental), como se aprecian en la Figura 13.



Figura 13. Unidad experimental en estudio

Los explantes se mantuvieron en la cámara de crecimiento a $18^{\circ}\text{C} \pm 2$, una humedad relativa del 40% y un fotoperíodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad, como se aprecia en la Figura 14. Adicionalmente, se realizó un ensayo por duplicado, con los mismos explantes cultivados en las cajas Petri, con los medios de cultivo, las hormonas y dosis indicadas en los tratamientos (Tabla 4), en el que se evaluó dos fotoperíodos (F1= 16 horas oscuridad + 8 horas luz; F2= 24 horas oscuridad + 0 horas luz) a las mismas condiciones de humedad y temperatura, como se indica en la Figura 15. Las variables registradas fueron cada 10 días, hasta los 60 días, después de la siembra de los explantes.



Figura 14. Tratamientos en fotoperíodo (8h luz/16h oscuridad)



Figura 15. Tratamientos en oscuridad

4.3 Evaluación estadística de los resultados

Con los datos obtenidos se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. Cuando existió diferencias entre los factores y su interacción, se realizó el análisis funcional de separación de medias, utilizando Diferencia mínima significativa (LSD) con un $\alpha=0.05$ para establecer las diferencias entre los tratamientos.

5 CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Oxidación de las hojas

En la Tabla 6, se presentan los ANOVA de las hojas oxidadas en 6 períodos de tiempo evaluados cada 10 días a partir de explantes de hojas enteras provenientes de *vitro* plantas, con fotoperíodo 1 (16 h oscuridad y 8 h luz). Los ANOVA's se realizaron con la transformación de $\sqrt{x+1}$ puesto que los datos no se ajustan a una distribución normal.

5.1.1 Fotoperíodo 1 (8 h luz/16 h oscuridad)

En la evaluación a los 10 días, no se detectaron efectos de los medios de cultivo (M), ni de las hormonas (H) en la oxidación de hojas de mortiño, mientras que hubo un efecto de las dosis de hormonas (D) y las interacciones MxH y MxHxD en la oxidación de hojas. Por su parte, a los 20 días se observó un efecto de los medios y las interacciones MxH y MxD en la oxidación de las hojas, mientras que los otros factores fueron estadísticamente iguales. A los 30 días se observó diferencias estadísticas al 5% únicamente para M. Mientras que no se presentaron diferencias estadísticas para los otros períodos de tiempo (40 d, 50 d y 60 d). Los coeficientes de variación fluctuaron entre 13.97 a 28.93 % (Tabla 6).

Tabla 6

Análisis de Varianza del número de hojas oxidadas, evaluadas con diferentes medios de cultivo, hormonas y dosis en 6 periodos de tiempo, con fotoperíodo 16/8h luz

F. V.	gl	10 días		20 días		30 días		40 días		50 días		60 días	
		SC	CM	SC	CM	SC	CM	SC	CM	SC	CM	SC	CM
Total	59	2.65	7.09	9.39	7.21	4.53	4.23						
Medios (M)	1	0.01	0.01 ^{ns}	0.34*	0.88*	0.05 ^{ns}	0.04 ^{ns}	4.00e ⁻³					
Hormonas (H)	2	2.70e ⁻³	2.70e ⁻³	0.18 ^{ns}	0.26 ^{ns}	4.5e ⁻⁴	0.06 ^{ns}	0.03	0.02 ^{ns}	0.03	0.02 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.02 ^{ns}
Dosis (D)	1	0.51	0.51**	0.21 ^{ns}	0.15 ^{ns}	0.20	0.2 ^{ns}	3.50e ⁻⁵	0.02 ^{ns}	3.50e ⁻⁵	0.02 ^{ns}	3.50e ⁻⁵	3.50e ⁻⁵
MxH	2	0.46	0.23*	0.95**	0.30	0.15 ^{ns}	0.13 ^{ns}	0.07	0.04 ^{ns}	0.07	0.04 ^{ns}	0.07	0.04 ^{ns}
MxD	1	1.50e ⁻⁴	1.50e ⁻⁴	0.48**	0.4 ^{ns}	4.90e ⁻⁴	4.90e ⁻⁴	3.00e ⁻²	4.90e ⁻⁴	3.00e ⁻²	4.90e ⁻⁴	3.00e ⁻²	4.90e ⁻⁴
HxD	2	0.03	0.01 ^{ns}	0.29	0.10	0.05 ^{ns}	0.14 ^{ns}	0.01	0.05 ^{ns}	0.01	0.14 ^{ns}	0.01	0.01 ^{ns}
MxHxD	2	0.47	0.23**	0.10	0.05 ^{ns}	0.03	0.02 ^{ns}	0.31	0.02 ^{ns}	0.21	0.11 ^{ns}	0.31	0.16 ^{ns}
Repeticiones	4	0.13	0.03	0.04	0.01	0.83	0.21	0.06	0.83	0.06	0.02	0.05	0.01
EE	44	1.05	0.02	6.73	0.15	5.48	0.12	3.71	5.48	3.71	0.08	3.71	0.08
CV (%)		13.97	21.22	28.93	27.93	24.48	24.48	24.88	27.93	24.48	24.48	24.88	24.88

ns no significativo; * significativo (<5%); ** altamente significativo (<1%)

Como se observa en la Tabla 7 la menor oxidación (rango “b”) se presentó a los 20 y 30 días con WPM (M2) con promedios de 0.63 y 0.47 hojas oxidadas, respectivamente; mientras que la oxidación con MS prácticamente se duplicó en estos mismos períodos de tiempo (rango “a”). Es importante resaltar que la mayor oxidación en general se observó a los 20 días, esto se debe a que algunos explantes que presentaron oxidación, lograron recuperarse con el pasar del tiempo. Mientras a los 30 días, los explantes presentaron regeneración de tejido, permitiendo que estos tengan nuevos brotes. Estos resultados concuerdan con lo propuesto por Debnath (2005) y Cobo et al. (2018) donde establecen a WPM como medio ideal para micropropagación de especies del género *Vaccinium*, ya que se trata de una especie leñosa; este medio se comporta de mejor manera para este tipo de tejidos.

Tabla 7

Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, evaluadas en 2 medios de cultivo, a los 20 y 30 días de siembra de los explantes, 2018

Medios cultivo	H. oxidadas 20 d	H. oxidadas 30 d
1 (0.5 MS)	1.33 ± 1.12 a	0.90 ± 0.99 a
2 (WPM)	0.63 ± 1.18 b	0.47 ± 1.01 b

Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

Respecto a las dosis de hormona (Tabla 8), se observó que la dosis baja (2 mg L⁻¹) fue 17 veces menor que la dosis alta (4 mg L⁻¹), representados por los rangos “b” y “a”, respectivamente.

Tabla 8

Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño del factor 3 (dosis altas y bajas), evaluadas a los 10 días de siembra, 2018

Dosis hormonas	H. oxidadas (10 d)
1 (alta)	0.50 ± 0,68 a
2 (baja)	0.03 ± 0,18 b

Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

Con estos resultados obtenidos se puede inferir que la oxidación se puede presentar en general hasta los 30 días, posteriormente, va disminuyendo como consecuencia que el explante se adaptó al medio de cultivo, ya que la oxidación disminuye a partir del día 40. Esto se asemeja con lo reportado por Debnath (2005), en medios de establecimiento, donde los explantes tienden a responder mejor a las condiciones *in vitro* hasta las 8 semanas, sin embargo, estos tiempos van a depender de la concentración de sales presentes, de la fuente de carbono, de fitorreguladores y de las condiciones de iluminación a las que estén sometidas. Por otro lado Magnitskiy et al. (2011) expresa que el tiempo de oxidación va a depender del grado de lignificación que presente el explante o el estadio de crecimiento, por lo general los explantes jóvenes poseen poca cantidad de lignina en sus paredes celulares con respecto a los explantes viejos, es por esta razón que se oxidan con facilidad.

Respecto a la interacción MxH (Tabla 9) nos muestra que hasta los 20 días de siembra el tratamiento MS + TZR y WPM + TDZ no presentaron oxidación (rango “c”), posiblemente porque las condiciones donde crecieron fueron favorables.

Tabla 9

Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, de las interacciones de los factores 1 y 2 (M x H), a los 10 y 20 días de siembra, 2018.

Medios cultivo	Hormonas	H. oxidadas 10d	H. oxidadas 20d
1 (0.5 MS)	1 (TDZ)	0.60 ± 0.84 a	1.70 ± 1.42 a
2 (WPM)	3 (TZR)	0.50 ± 0.76 ab	0.80 ± 1.14 ab
1 (0.5 MS)	2 (ZEA)	0.30 ± 0.48 abc	1.00 ± 0.67 ab
2 (WPM)	2 (ZEA)	0.20 ± 0.42 bc	0.60 ± 0.70 bc
2 (WPM)	1 (TDZ)	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c
1 (0.5 MS)	3 (TZR)	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c

Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

Para la interacción MxD (Tabla 10) el menor promedio de oxidación se presentó a los 20 días en WPM + dosis baja (rango “b”), con un valor de 0.07.

Tabla 10

Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, de las interacciones de los factores 1 y 3 (M x D), 20 días de siembra, 2018.

Medios cultivo	Dosis	H. oxidadas 20d
1 (1/2 MS)	2 (baja)	1.00 ± 1.25 a
2 (WPM)	1 (alta)	0.87 ± 0.99 a
1 (1/2 MS)	1 (alta)	0.80 ± 1.01 a
2 (WPM)	2 (baja)	0.07 ± 0.26 b

Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

En cuanto a la interacción MxDxH (Tabla 11) los tratamientos (MS + TZR + Alta, MS + TZR + Baja, MS + TDZ + Baja, WPM + TDZ + Baja, WPM + TZR + Baja, WPM + TDZ + Alta, WPM + ZEA + Baja) presentan los promedios más bajos de oxidación de explantes, ocupando el rango "b" (LSD 5%); mientras que los tratamientos MS + TDZ + Alta y WPM + TZR + Alta, están ubicados en el rango "a" (LSD 5%) y son los que presentan los promedios más altos para la oxidación de los explantes.

Tabla 11

Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, de las interacciones de los 3 factores (M x H x D) a los 20 días de siembra, 2018.

Medios cultivo	Hormonas	Dosis	H. oxidadas 10d
1 (0.5 MS)	1 (TDZ)	1 (alta)	1.20 ± 0.84 a
2 (WPM)	3 (TZR)	1 (alta)	1.00 ± 0.71 a
2 (WPM)	2 (ZEA)	1 (alta)	0.40 ± 0.55 ab
1 (0.5 MS)	2 (ZEA)	1 (alta)	0.40 ± 0.55 ab
1 (0.5 MS)	2 (ZEA)	2 (baja)	0.20 ± 0.55 ab
1 (0.5 MS)	3 (TZR)	1 (alta)	0.00 ± 0.00 b
2 (WPM)	1 (TDZ)	2 (baja)	0.00 ± 0.00 b
2 (WPM)	3 (TZR)	2 (baja)	0.00 ± 0.00 b
2 (WPM)	1 (TDZ)	1 (alta)	0.00 ± 0.00 b
1 (0.5 MS)	3 (TZR)	2 (baja)	0.00 ± 0.00 b
1 (0.5 MS)	1 (TDZ)	2 (baja)	0.00 ± 0.00 b
2 (WPM)	2 (ZEA)	2 (baja)	0.00 ± 0.00 b

Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

La figura 16 indica una comparación entre los medios MS (izquierda) y WPM (derecha)



Figura 16. Fotografía de la oxidación de explantes en MS vs. WPM

5.1.2 Fotoperíodo 2 (24 h oscuridad)

Como se observa en la tabla 12, existió un efecto en el factor H desde los 10 hasta los 60 días después de cultivar el explante. Por otro lado, los factores M y D no presentaron diferencias significativas en ningún período de tiempo de cultivo.

En la interacción MxH se detectaron diferencias estadísticas para esta variable a los 30 y 60 días, mientras que para la interacción MxD existieron diferencias a los 20 y 30 d. Este efecto se incrementó para la interacción HxD ya que hubo diferencias a los 40, 50 y 60 d. Finalmente, para la interacción MxHxD, se encontraron diferencias estadísticas únicamente a los 40 días (Tabla 12). Los coeficientes de variación desde los 10 días hasta los 60 días fueron: 19.56%, 21.56%, 26.02%, 18.54%, 27.41% y 27.86%, respectivamente.

Tabla 12

Análisis de Varianza del número de hojas oxidadas, evaluadas con diferentes medios de cultivo, hormonas y dosis en 6 periodos de tiempo con 24h oscuridad, 2018.

F. V.	gl	10 días		20 días		30 días		40 días		50 días		60 días	
		SC	CM	SC	CM	SC	CM	SC	CM	SC	CM	SC	CM
Total	59	3.24		4.37		11.62		9.66		9.61		11.00	
Medios (M)	1	0.07	0.07 ^{ns}	0.04	0.04 ^{ns}	0.20	0.20 ^{ns}	0.15	0.15 ^{ns}	1.10e ⁻⁴	1.10e ^{-4ns}	4.5e ⁻³	4.5e ^{-3ns}
Hormonas (H)	2	0.43	0.21 ^{**}	0.51	0.26 [*]	1.35	0.68 ^{**}	0.68	0.34 [*]	0.77	0.39 [*]	1.80	0.90 ^{**}
Dosis (D)	1	0.01	0.01 ^{ns}	0.08	0.08 ^{ns}	0.22	0.22 ^{ns}	3.50e ⁻³	3.50e ^{-3ns}	1.90e ⁻⁴	1.90e ^{-4ns}	0.16	0.16 ^{ns}
MxH	2	0.17	0.08 ^{ns}	0.23	0.12 ^{ns}	1.19	0.59 ^{**}	0.26	0.13 ^{ns}	0.31	0.16 ^{ns}	0.89	0.44 ^{**}
MxD	1	0.01	0.01 ^{ns}	0.21	0.21 [*]	0.55	0.55 [*]	0.07	0.07 ^{ns}	0.07	0.07 ^{ns}	0.16	0.16 ^{ns}
HxD	2	0.13	0.06 ^{ns}	0.11	0.88 ^{ns}	0.14	0.07 ^{ns}	2.02	1.01 ^{**}	1.16	0.58 [*]	0.98	0.49 [*]
MxHxD	2	0.13	0.06 ^{ns}	0.21	1.68 ^{ns}	1.68	0.84 ^{ns}	2.53	1.26 ^{**}	0.25	0.13 ^{ns}	0.01	0.01 ^{ns}
Repeticiones	4	0.21	0.05	0.18	0.05	0.26	0.47	0.47	0.12	0.35	0.09	0.16	0.04
EE	44	2.10	0.05	2.79	0.06	6.03	0.14	3.49	0.08	6.69	0.15	6.83	0.16
CV (%)		19.56		21.56		26.02		18.54		27.41		27.86	

ns no significativo; * significativo (<5%); ** altamente significativo (<1%)

En oscuridad el efecto de las hormonas tuvo otro comportamiento con respecto al fotoperíodo 1, como se observa en la (Tabla 13) la interacción del factor H indica que existe una diferencia en los promedios de oxidación de los explantes en los 6 períodos de tiempo (10 – 60 días), siendo TDZ la que presentó menores promedios de oxidación (rango “b”), seguida de TZR con promedios que fluctúan entre 0.20 a 1.85 (rango “ab”) y ZEA con los promedios más altos (0.60 a 1.90) de oxidación de hojas (rango “a”).

Tabla 13

Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, evaluadas con 3 hormonas (TDZ, ZEA, TZR), medidos desde los 10 días hasta los 60 días de siembra, tratamiento con oscuridad, 2018.

Hormona	H. oxidadas 10d	H. oxidadas 20d	H. oxidadas 30d	H. oxidadas 40d	H. oxidadas 50d	H. oxidadas 60d
2 (ZEA)	0.60 ± 0.75 a	0.75 ± 0.97 a	1.85 ± 1.53 a	1.85 ± 1.35 a	1.65 ± 0.93 a	1.90 ± 1.45 a
3 (TZR)	0.20 ± 0.62 b	0.30 ± 0.37 b	1.10 ± 1.41 b	1.45 ± 0.89 b	1.05 ± 1.27 b	1.85 ± 1.31 ab
1 (TDZ)	0.10 ± 0.31 b	0.15 ± 0.66 b	0.70 ± 0.92 b	1.10 ± 1.41 b	0.85 ± 1.32 b	1.10 ± 1.41 b

Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

En la primera interacción MxH (Tabla 14), los resultados obtenidos revelaron que a los 30 y 60 días WPM x TDZ presentaron los promedios más bajos de oxidación con 0.30 (rango “d”) y 1.00 (rango “b”), respectivamente.

Tabla 14. *Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, de la interacción MxH a los 30 y 60 días de siembra, 2018.*

Medio cultivo	Hormona	H. oxidadas 30 d	H. oxidadas 60 d
2 (WPM)	2 (ZEA)	2.20 ± 1.23 a	0.90 ± 1.20 a
2 (WPM)	3 (TZR)	1.70 ± 1.63 ab	1.30 ± 0.82 ab
1 (0.5 MS)	2 (ZEA)	1.50 ± 1.78 abc	1.30 ± 1.34 b
1 (0.5 MS)	1 (TDZ)	1.10 ± 1.10 bcd	0.90 ± 1.52 b
1 (0.5 MS)	3 (TZR)	0.50 ± 0.71 cd	2.40 ± 1.35 b
2 (WPM)	1 (TDZ)	0.30 ± 0.48 d	1.00 ± 0.67 b

Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

En la segunda interacción MxD (Tabla 15), reveló que MS y una dosis baja de hormona obtuvieron los mejores resultados con respecto a WPM, los valores son de 0.20 a los 20 días y 0.53 a los 30, representados por los rangos “b”.

Tabla 15. Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, de la interacción Medio x Hormona a los 30 y 60 días de siembra, 2018.

Medio cultivo	Dosis	H. oxidada 20d	H. oxidada 30d
1 (0.5 MS)	1 (alta)	0.73 ± 0.96 a	1.53 ± 1.55 a
2 (WPM)	2 (baja)	0.40 ± 0.83 ab	1.53 ± 1.60 a
2 (WPM)	1 (alta)	0.27 ± 0.59 ab	1.27 ± 1.33 ab
1 (0.5 MS)	2 (baja)	0.20 ± 0.41 b	0.53 ± 0.74 b

Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

La interacción de los tres factores (MxHxD) a los 30 días presentaron 8 rangos con la prueba LSD al 5% (Tabla 16). Siendo el tratamiento de la interacción WPM + TDZ + 3 mg L⁻¹ (rango “e”) el que presentó el menor promedio de explantes oxidados (0); mientras que MS + ZEA + 4 mg L⁻¹ tuvo el mayor promedio de explantes oxidados con 3.40 (rango “a”).

Tabla 16. Promedios de la oxidación de las hojas de mortiño, de la interacción MxHxD a los 30 días de siembra, 2018.

Medio cultivo	Hormona	Dosis	H. oxidadas 30d
1 (0.5 MS)	2 (ZEA)	1 (alta)	3.40 ± 0.89 a
1 (0.5 MS)	1 (TDZ)	2 (baja)	3.20 ± 0.84 a
2 (WPM)	2 (ZEA)	1 (alta)	1.80 ± 1.10 b
2 (WPM)	2 (ZEA)	2 (baja)	1.60 ± 0.89 bc
2 (WPM)	3 (TZR)	1 (alta)	1.60 ± 1.14 bc
2 (WPM)	3 (TZR)	2 (baja)	1.40 ± 0.89 bcd
1 (0.5 MS)	3 (TZR)	1 (alta)	1.40 ± 0.55 bcd
1 (0.5 MS)	3 (TZR)	2 (baja)	1.40 ± 1.14 bcd
2 (WPM)	1 (TDZ)	1 (alta)	0.80 ± 0.84 bcde
1 (0.5 MS)	2 (ZEA)	2 (baja)	0.60 ± 0.89 cde
1 (0.5 MS)	1 (TDZ)	2 (baja)	0.40 ± 0.55 de
2 (WPM)	1 (TDZ)	1 (alta)	0.00 ± 0.00 e

Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

Acorde a los resultados obtenidos, podemos inferir que existe una diferencia en la interacción de las hormonas con el medio de cultivo, mismo que está dependiendo de la intensidad de luz a la que son expuestos los explantes. Esto puede deberse a la estructura molecular de éstas o a otros factores que no fueron tomados en cuenta en este estudio, como el genotipo del explante, intensidad luminosa, entre otros. Según Scalzo et al. (2016) el genotipo de la planta, junto con el medio de cultivo y la intensidad luminosa durante la incubación son fundamentales para un buen desarrollo *in vitro* del explante. El autor manifiesta que una baja luminosidad, y con los factores similares de este estudio (hormonas, medios de cultivo y las dosis), se obtuvieron altas longitudes de explantes, alto porcentaje de formación de callos, numerosos brotes por explante en las 6 variedades de *Vaccinium* estudiadas. Es importante mencionar que, para el presente estudio, se desconocía la procedencia del mortiño, de donde se obtuvieron las *in vitro* plantas. Los efectos de los medios de cultivo y dosis de hormonas en las dos condiciones de fotoperíodo se asemeja a lo reportado por Scalzo et al., (2016), ya que no reportan promedios de oxidación de explantes a pesar de que los autores utilizan otras concentraciones de hormonas y aumentan el tiempo de cultivo a 90 días.

En la Figura 17 se puede observar una caja Petri con todos sus explantes influenciados por los factores en estudio, en donde: a) representa una hoja oxidada de coloración pardo; b) representa una hoja con necrosis (muerta); c) es una hoja oxidada con un brote (regeneración) y d) una hoja con callo organogénico.

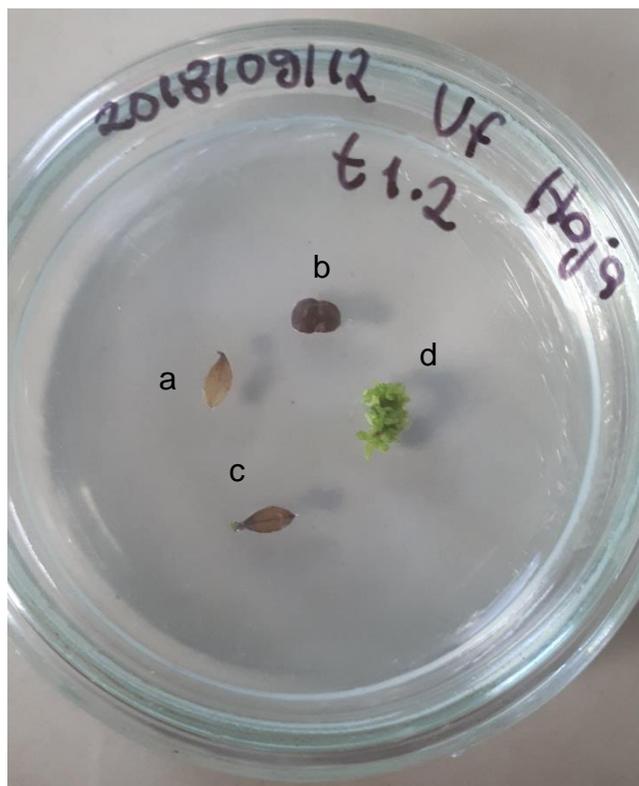


Figura 17. Fotografía del tratamiento 1.2: a) hoja oxidada; b) hoja muerta; c) hoja oxidada con brote y d) hoja con callo

5.1.3 Fotoperíodo 1 vs. Fotoperíodo 2

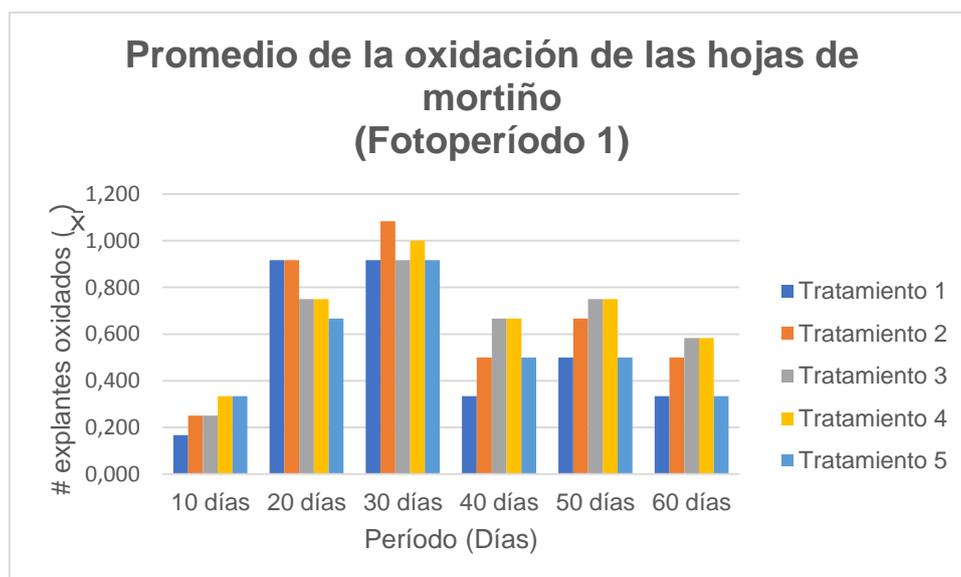


Figura 18. Promedio de la oxidación de hojas de mortiño en 6 períodos de tiempo, evaluados cada 10 días, con fotoperíodo 1

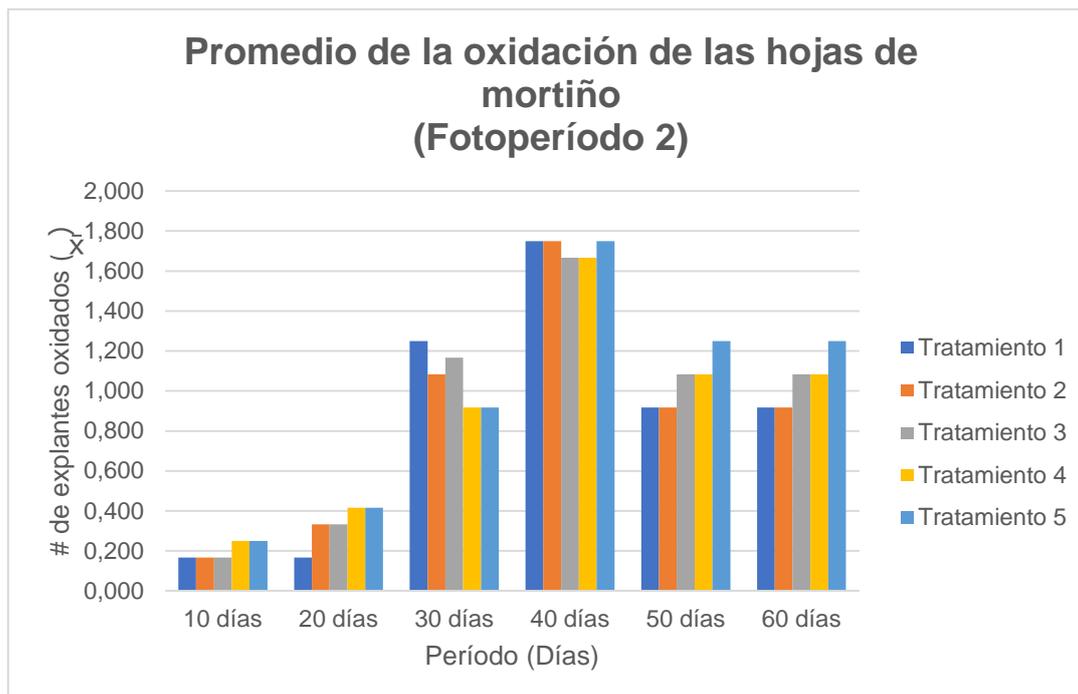


Figura 19. Promedio de la oxidación de hojas de mortiño en 6 períodos de tiempo, evaluados cada 10 días, con fotoperíodo 2

Considerando los promedios de hojas oxidadas se puede indicar de manera general que existe una mayor oxidación cuando los explantes están expuestos a un fotoperíodo 2 (figura 19), frente al fotoperíodo 1 (figura 18). Cabe mencionar que no existe un patrón claro de la oxidación, sin embargo, se puede inferir que al inicio de la siembra de los explantes hay mayor probabilidad de que se presenten hojas oxidadas antes que al final del período (60 días). Estos resultados se sustentan con lo reportado por Azofeita (2009) en un estudio de “cultivo *in vitro*”, quien expresa que la oxidación celular se da como resultado de un estrés oxidativo ocasionado por lesiones o cortes efectuados en la planta, donde intervienen moléculas denominadas ROS y RNS (especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, respectivamente), en forma conjunta con las enzimas oxidasas como la polifenol oxidasa (PPO), que generan una reacción en cascada. La PPO empieza a actuar cuando la célula recibe un daño o lesión, resultando la muerte del explante, en la mayoría de los casos ocasionada por la necrosis. Existen factores que desencadenan el estrés oxidativo o pueden aumentar su

efecto como es el caso de la intensidad de luz, la magnitud del corte o el componente (sales minerales) del medio de cultivo. En la etapa de establecimiento *in vitro* (siembra en los medios de cultivo), los explantes luego de ser separados de la planta madre, se empezaron a estresar y perdieron su coloración verde, tornándose oscuros. El autor mencionado anteriormente indica que otro factor que produce la oxidación es el O_2 , lo cual se evidenció en los primeros 30 días de haber sembrado en las cajas Petri, las hojas empezaron a oxidarse muy rápido, pasado ese tiempo, la oxidación no afectó a las células ya que algunos explantes se regeneraron.

En la Figura 21 se puede observar una comparación entre fotoperíodos: fotoperíodo 1 (izquierda), fotoperíodo 2 (derecha), donde visualmente se evidencia que con oscuridad la planta se desarrolla más, con respecto al tratamiento con luz.

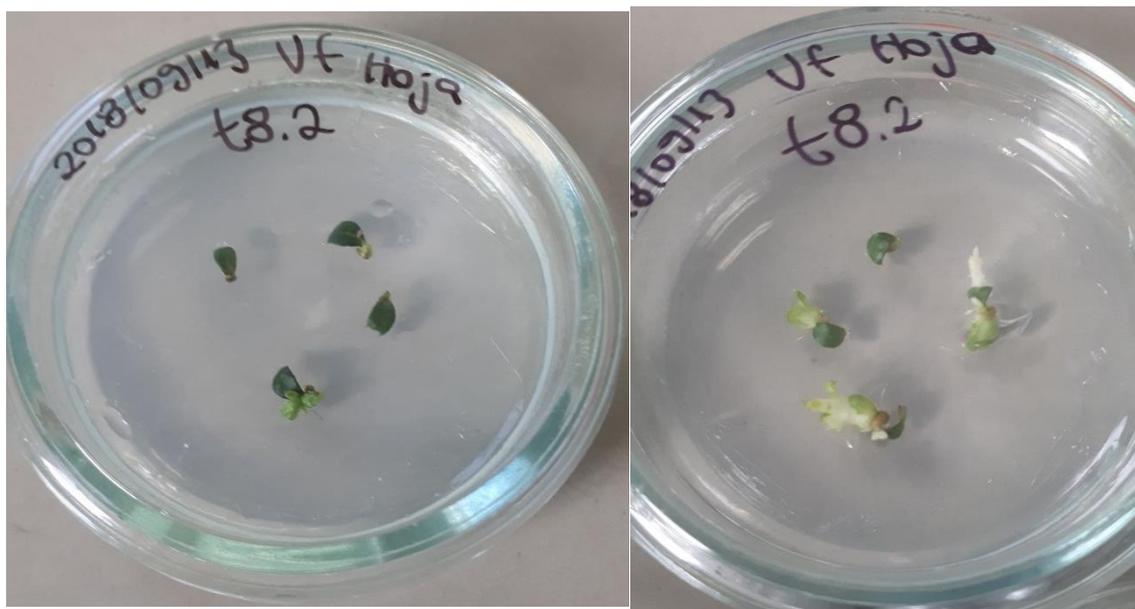


Figura 20. Fotografía tratamiento 8.2 luz (izquierda) y oscuridad (derecha).

5.1.4 Número de explantes muertos

5.1.4.1 Número de explantes muertos en Fotoperíodo 1

En la Tabla 17 se presenta los ANOVA de las hojas muertas en 6 períodos de tiempo evaluados cada 10 días a partir de explantes de hojas enteras provenientes de *vitro* plantas, con fotoperíodo (16 h oscuridad y 8h luz). Los ANOVA´s se realizaron con la transformación de $\sqrt{x + 1}$ puesto que los datos no se ajustan a una distribución normal.

Se observó un efecto de los medios (M) a los 50 y 60 días después del cultivo. Las hormonas (H) tuvieron un efecto en el número de hojas muertas a los 50 y 60 días. Las dosis ni las interacciones tuvieron efecto. Los coeficientes de variación desde los 20 a los 60 días fluctuaron entre: 13.55%, 23.35%, 29.72%, 27.69%, 27.66%, respectivamente.

Tabla 17

Análisis de Varianza del número de hojas muertas, evaluadas con diferentes medios de cultivo, hormonas y dosis en 6 períodos de tiempo con 8 h luz y 16 h oscuridad, 2018.

F. V.	gl	20 días		30 días		40 días		50 días		60 días	
		SC	CM	SC	CM	SC	CM	SC	CM	SC	CM
Total	59	1.13		4.72		11.97		14.93		14.82	
Medios (M)	1	0.01	0.01 ^{ns}	0.20	0.2 ^{ns}	0.39	0.39 ^{ns}	1.61	1.61 ^{**}	1.43	1.43 [*]
Hormonas (H)	2	3.10e ⁻⁴	1.5e ^{-4ns}	0.01	2.8e ^{-3ns}	0.64	0.32 ^{ns}	2.07	1.03 [*]	1.38	0.69 ^{ns}
Dosis (D)	1	0.04	0.04 ^{ns}	0.15	0.15 ^{ns}	1.20e ⁻³	1.2e ^{-3ns}	0.24	0.24 ^{ns}	0.01	0.01 ^{ns}
M x H	2	0.09	0.04 ^{ns}	0.10	0.05 ^{ns}	1.04	0.52 ^{ns}	0.04	0.14 ^{ns}	0.01	0.01 ^{ns}
M x D	1	0.04	0.04 ^{ns}	0.06	0.06 ^{ns}	0.02	0.02 ^{ns}	0.14	0.01 ^{ns}	0.14	0.14 ^{ns}
H x D	2	0.02	0.01 ^{ns}	0.12	0.17 ^{ns}	0.05	0.02 ^{ns}	0.02	0.33 ^{ns}	0.04	0.02 ^{ns}
M x H x D	2	0.02	0.01 ^{ns}	0.34	0.07 ^{ns}	0.48	0.24 ^{ns}	0.66	0.22 ^{ns}	0.81	0.40 ^{ns}
Repeticiones	4	0.04	0.01	0.81	0.20	1.24	0.31	0.63	0.16	0.84	0.21
EE	44	0.87	0.02	2.93	-	8.10	0.18	9.51	-	10.16	0.23
CV (%)		13.55		23.35		29.72		27.69		27.66	

ns no significativo; * significativo (<5%); ** altamente significativo (<1%)

La tabla 18 indica que WPM tuvo menores promedios de muerte de explantes a los 50 y 60 días, con valores de 1.51 y 1.58, respectivamente, representados por los rangos “b”. Por otro lado, el mayor promedio de hojas muertas se dio en MS con 1.84 y 1.89 a los mismos tiempos (rango “a”).

Tabla 18

Promedios de hojas muertas de mortíño, evaluadas en 2 medios de cultivo, sembradas con 8 h luz y 16 h oscuridad a los 50 y 60 días de siembra de los explantes, 2018.

Medios cultivo	H. muertas 50 d	H. muertas 60 d
1 (0.5 MS)	1.84 ± 1.45 a	1.89 ± 1.50 a
2 (WPM)	1.51 ± 1.68 b	1.58 ± 1.65 b

Promedios seguidas de las mismas letras son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

Tabla 19

Promedios de hojas muertas de mortíño, evaluados con 3 hormonas 50 días de siembra, 2018.

Hormona	H. muertas 50d
2 (ZEA)	1.82 ± 1.67 a
3 (TZR)	1.80 ± 1.50 a
1 (TDZ)	1.42 ± 1.40 b

Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

Cuando se evaluó las hormonas (H), los resultados indican que la menor muerte de explantes tuvo con la hormona TDZ, con promedio de 1.42 (rango “b”, con respecto a las demás (Tabla 19). Finalmente, el tercer factor, ni las interacciones presentaron diferencias estadísticas.

Es importante señalar que ningún autor reporta la muerte de los explantes como variables de respuesta, pero una posible causa es el exceso de sales minerales, algunos autores como Brenes et al. (2015); Jiménez & Abdelnourl (2018); Tetsumura et al. (2008) expresan que el mejor medio de cultivo para la propagación de especies vegetales leñosas es el WPM, ya que tiene los micro

y macroelementos adecuados para el cultivo de estas especies; sin embargo, el efecto de las hormonas y fuentes de carbono influyen en el desarrollo de estas. En el presente estudio, se evidenció que WPM tuvo los promedios más bajos de oxidación y de muerte de los explantes.

5.1.4.2 Número de explantes muertos en Fotoperíodo 2

Cuando se evaluó la muerte de las hojas de mortiño en el fotoperíodo 2 (24 h oscuridad) se observó un efecto de las hormonas a los 50 y 60 días. El factor (D) presentó efectos a los 40 días. No se evidenciaron efectos en el factor M. En la interacción MxH se detectaron diferencias estadísticas para esta variable a los 30, 40, 50 y 60 días, mientras que para la interacción MxD existieron diferencias a los 40 días. Para la interacción HxD solo hubo efecto a los 40 días. Finalmente, para la interacción de segundo grado MxHxD, se encontraron diferencias estadísticas únicamente a los 40 días (Tabla 20). Los coeficientes de variación desde los 20 días hasta los 60 días fueron: 10.91%, 24.73%, 22.23%, 26.25% y 26.60%, respectivamente.

Tabla 20

Análisis de Varianza del número de hojas muertas, evaluadas con diferentes medios de cultivo, hormonas y dosis en 6 períodos de tiempo con fotoperíodo (24 h oscuridad), 2018.

F. V.	gl	20 días		30 días		40 días		50 días		60 días	
		SC	CM	SC	CM	SC	CM	SC	CM	SC	CM
Total	59	0.84		5.40		11.94		16.21		16.76	
Medios (M)	1	0.04	0.02 ^{ns}	0.02	0.02 ^{ns}	0.09	0.09 ^{ns}	0.03	0.03 ^{ns}	0.13	0.13 ^{ns}
Hormonas (H)	2	0.02	0.01 ^{ns}	0.49	0.24 ^{ns}	0.19	0.10 ^{ns}	1.53	0.76*	2.14	1.07**
Dosis (D)	1	0.04	0.04 ^{ns}	0.07	0.07 ^{ns}	4.70e ⁻¹	0.47*	0.17	0.17 ^{ns}	0.30	0.30 ^{ns}
M x H	2	0.02	0.01 ^{ns}	0.72	0.36**	3.32	1.66**	3.49	1.74**	2.76	1.38**
M x D	1	0.02	0.04 ^{ns}	4.70e ⁻³	4.70e ^{-3ns}	0.35	0.35**	0.66	0.66 ^{ns}	0.65	0.65 ^{ns}
H x D	2	0.02	0.01 ^{ns}	0.06	0.03 ^{ns}	1.74	0.87*	1.00	0.50 ^{ns}	0.93	0.47 ^{ns}
M x H x D	2	0.02	0.01 ^{ns}	0.44	0.22 ^{ns}	1.37	0.68**	0.60	0.30 ^{ns}	0.44	0.22 ^{ns}
Repeticiones	4	0.02	0.02	0.12	0.03	0.50	0.12	0.71	0.18	0.73	0.18
EE	44	0.55	0.01	3.48	0.08	3.92	0.09	8.03	0.18	8.68	0.20
CV (%)		10.91		24.73		22.23		26.25		26.60	

ns no significativo; * significativo (<5%); ** altamente significativo (<1%)

Los resultados obtenidos del efecto de las hormonas en el número de explantes muertos en fotoperíodo 2 (Tabla 21) indican que a los 50 y 60 días se presentaron los promedios más bajos de muerte para la hormona TZR con valores de 1.35 y 1.45, respectivamente. Por otro lado, los promedios más altos se presentaron en ZEA con 2.60 y 2.90 para ambos períodos de tiempo. Los rangos “a” corresponden a los promedios altos de muerte, los “b” a los promedios más bajos de muerte.

Tabla 21

Promedios de hojas muertas de mortiño, evaluados con 3 hormonas en oscuridad, a los 50 días de siembra, 2018.

Hormona	H. muertas 50 d	H. muertas 60 d
2 (ZEA)	2.60 ± 1.50 a	2.90 ± 1.40 a
1 (TDZ)	1.80 ± 1.85 ab	1.82 ± 1.84 b
3 (TZR)	1.35 ± 1.46 b	1.45 ± 1.57 b

Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

Los resultados obtenidos de la interacción MxH (Tabla 22), nos indican que los promedios más bajos de muerte de los explantes se dio a los 30, 40, 50 y 60 días con el medio WPM + TDZ con 0.00, 0.10, 0.60 y 0.70, respectivamente y los promedios de muerte más altos se dieron en MS + TDZ en los mismos períodos de tiempo con valores de 1.00, 2.00, 3.00 y 3.00, respectivamente.

Tabla 22

Promedios del número de hojas muertas para la interacción M x H, evaluados a los 30, 40, 50 y 60 días en oscuridad, 2018.

Medio cultivo	Hormona	H. muertas 30d	H. muertas 40d	H. muertas 50d	H. muertas 60d
1 (0.5 MS)	1 (TDZ)	1.00 ± 0.92 bc	2.00 ± 2.11 a	3.00 ± 1.70 a	3.00 ± 1.70 a
2 (WPM)	2 (ZEA)	0.80 ± 1.25 c	1.90 ± 1.19 a	3.00 ± 1.15 a	3.10 ± 1.20 a
1 (0.5 MS)	2 (ZEA)	0.40 ± 1.26 abc	0.50 ± 1.27 bc	2.20 ± 1.15 bc	2.70 ± 1.64 a
2 (WPM)	3 (TZR)	0.00 ± 0.00 a	1.20 ± 1.23 ab	1.90 ± 1.66 ab	1.90 ± 1.66 ab
1 (0.5 MS)	3 (TZR)	0.10 ± 0.32 ab	0.30 ± 0.48 c	0.80 ± 1.03 c	1.00 ± 1.41 b
2 (WPM)	1 (TDZ)	0.00 ± 0.00 a	0.10 ± 0.32 c	0.60 ± 1.07 c	0.70 ± 1.16 b

Las medias seguidas de las mismas letras son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

La interacción MxD (Tabla 23) presentó que el tratamiento MS + dosis baja de hormona tuvo el menor promedio de muerte de explantes con 0.40, representado por el rango “b” a los 40 días de siembra.

Tabla 23

Promedios del número de hojas muertas para la Interacción MxD, evaluada a los 40 días de siembra, en oscuridad, 2018.

Medio cultivo	Dosis	H. muertas 40 d
1 (0.5 MS)	1 (alta)	1.47 ± 1.88 a
2 (WPM)	1 (alta)	1.13 ± 1.41 a
2 (WPM)	2 (baja)	1.00 ± 1.07 ab
1 (0.5 MS)	2 (baja)	0.40 ± 1.06 b

Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

La interacción HxD (Tabla 24) dio como resultado que en TDZ + dosis baja a los 40 días de siembra (rango “c”) no hubo muerte de explantes, con respecto a TDZ + dosis alta (rango “a”), donde tuvo los promedios más altos de muerte con valores de 2.10, en el mismo período de tiempo.

Tabla 24

Promedio del número de hojas muertas para la Interacción HxD, evaluada a los 40 días de siembra en oscuridad, 2018

Hormona	Dosis	H. muertas 40 d
1 (TDZ)	1 (alta)	2.10 ± 1.93 a
2 (ZEA)	2 (baja)	1.30 ± 1.49 ab
2 (ZEA)	1 (alta)	1.10 ± 1.37 b
3 (TZR)	2 (baja)	0.80 ± 0.79 bc
3 (TZR)	1 (alta)	0.70 ± 1.25 bc
1 (TDZ)	2 (baja)	0.00 ± 0.00 c

Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

Finalmente, la interacción de los tres factores MxHxD (Tabla 25) a los 40 días da como resultado que en MS + TDZ + dosis baja y WPM + TDZ + dosis baja no hay presencia de hojas muertas (rangos “e”), comparados con 0.5MS + TDZ + dosis alta (rango “a”) y WPM + ZEA + dosis alta (rango “b”) que presentaron

los promedios más altos de muerte de explantes con valores de 4 y 2 respectivamente.

Tabla 25

Promedio del número de hojas muertas para la interacción MxHxD, evaluada a los 40 días de siembra en oscuridad, 2018.

Medio cultivo	Hormona	Dosis	H. muertas 40 d
1 (0.5 MS)	1 (TDZ)	1 (alta)	4.00 ± 0.00 a
2 (WPM)	2 (ZEA)	1 (alta)	2.00 ± 1.41 b
2 (WPM)	2 (ZEA)	2 (baja)	1.80 ± 1.10 bc
2 (WPM)	3 (TZR)	2 (baja)	1.20 ± 0.83 bcd
2 (WPM)	3 (TZR)	1 (alta)	1.20 ± 1.64 bcd
1 (0.5 MS)	2 (ZEA)	2 (baja)	0.80 ± 1.79 cde
1 (0.5 MS)	3 (TZR)	2 (baja)	0.40 ± 0.55 de
1 (0.5 MS)	3 (TZR)	1 (alta)	0.20 ± 0.55 de
2 (WPM)	1 (TDZ)	1 (alta)	0.20 ± 0.45 de
1 (0.5 MS)	2 (ZEA)	1 (alta)	0.20 ± 0.45 de
2 (WPM)	1 (TDZ)	2 (baja)	0.00 ± 0.00 e
1 (0.5 MS)	1 (TDZ)	2 (baja)	0.00 ± 0.00 e

Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales en LSD al 5%.

Es importante señalar que cuando los explantes oxidados no se logran recuperar, las células se necrosan, ocasionando la muerte. Se ha reportado que la oxidación de los explantes del género *Vaccinium* es un serio problema durante el cultivo *in vitro*, como lo mencionan Azofeita (2009), Cobo et al. (2018), Debnath (2005), ya que intervienen varios factores como las sales minerales. Los autores indican que el exceso de microelementos Mn, Fe, B, pueden producir toxicidad al medio de cultivo y posterior la muerte del explante. Habría que mencionar también, que otra posible causa de la necrosis es la edad del explante, como lo mencionan Llivisaca et al. (2018) los compuestos antioxidantes del mortño empiezan a sintetizarse cuando la planta alcanza un estadio adulto, es decir, cuando el tallo se lignifica; puesto que se trataban de plantas *in vitro* jóvenes, los compuestos no estaban presentes en concentraciones suficientes para contrarrestar el estrés oxidativo y, con el exceso de sales minerales, el proceso de oxidación se aceleró produciendo

necrosis. Cabe mencionar que en estudios realizados de *Vaccinium* no mencionan la muerte o necrosis de los explantes como variable de respuesta, por lo que los resultados reportados no se pueden contrastar con investigaciones de otros autores.

En la Figura 21 se puede observar una comparación entre medios de cultivo MS (izquierda) vs. WPM (derecha). Los resultados obtenidos indican que hay un mayor número de explantes muertos en MS con respecto a WPM.

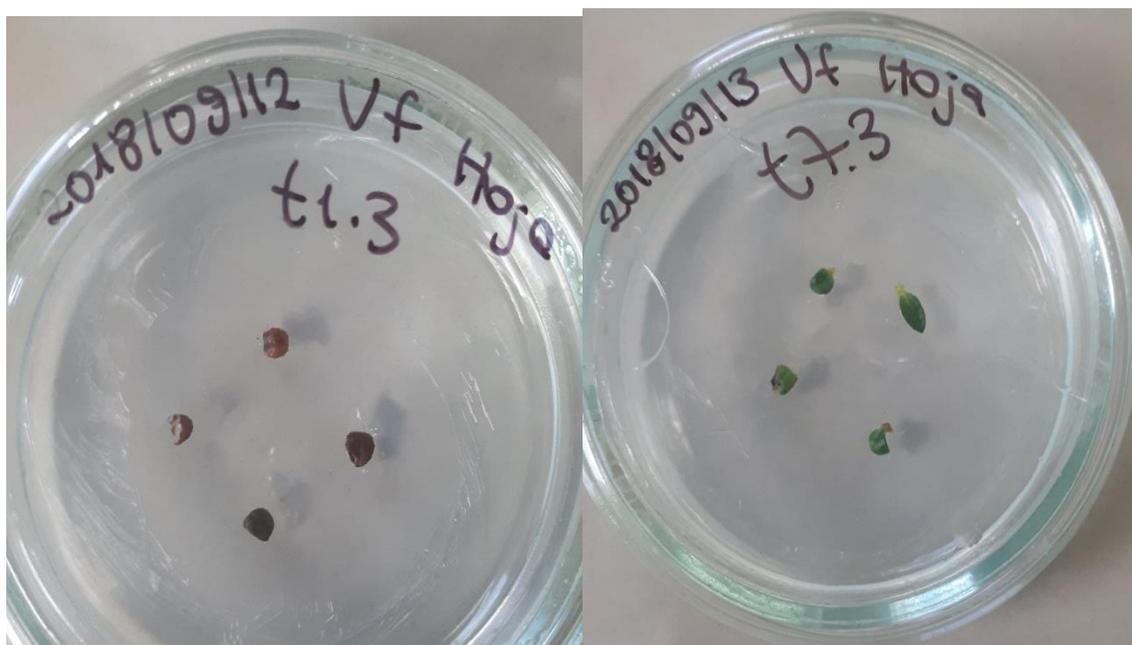


Figura 21. Comparación del número de hojas muertas en MS vs. WPM

Después de analizar los resultados se puede inferir que en oscuridad hubo menor número de explantes muertos con respecto al fotoperíodo con luz, sin embargo, estos resultados no pueden compararse con otros autores (Debnath & McRae, 2005; Liu et al., 2010) ya que no se toma a la muerte o necrosis como variables dependientes, sino se centran en crecimiento de longitud de tallo, número de brotes, formación de callos, entre otros. Cabe mencionar que una posible causa para que ocurra esto es que a menor intensidad luminosa, los explantes se desarrollan de mejor manera, como lo reportó Scalzo et al., (2016) que en baja luminosidad tuvo mayor formación de callo y mayor longitud de brotes con respecto a alta.

En la Figura 22 se puede observar una comparación entre tratamientos MS (arriba) vs. WPM (abajo), en donde se evidencia que en WPM existe menor número de hojas muertas con respecto a MS.

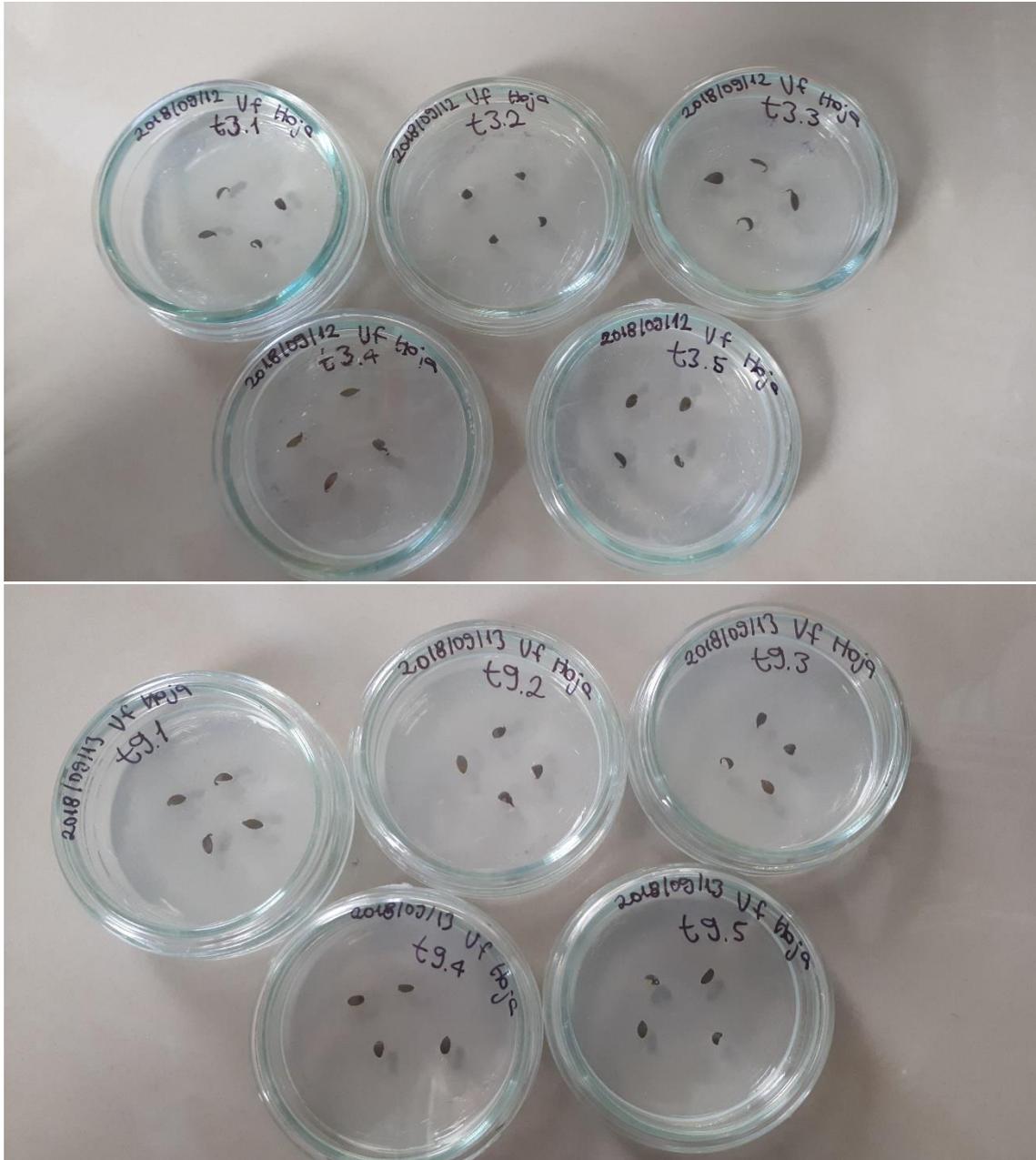


Figura 22. Número de hojas muertas en oscuridad MS (arriba) vs. WPM (abajo)

5.1.5 Presencia de callos

La variable presencia de callos se evaluó de manera cualitativa (Tabla 26), tanto en luz como en oscuridad. Cabe mencionar, que en algunos casos hubo formación, sin embargo, al final de los 60 días de evaluación algunos murieron, por lo que se reportó como muerte.

Como se observa en la Tabla 26, los resultados obtenidos en fotoperíodo en el medio MS, el 40% de los explantes formaron callo, el 0.33% murieron y el 56.67% no formaron callo; mientras que en el medio WPM se incrementó la formación de callo de los explantes en un 70%, 0% de muertos y 30% de los tratamientos no lo formaron. Los resultados variaron en oscuridad, en el medio MS los porcentajes de formación y muerte de los explantes aumentaron a 46.67% y 16.67%, respectivamente, mientras que el 36.67% de los explantes no formaron callos. Por otro lado, en WPM y oscuridad hubo el mayor porcentaje de formación de callo con 73.33%, el 3.33% murió y 23.33% de las hojas no evidenciaron formación.

Tabla 26

Porcentaje de presencia de callos de explantes de mortiño dos fotoperíodo, 2018.

	MS Fotoperíodo	MS Oscuridad	WPM Fotoperíodo	WPM Oscuridad
Formación	40%	46.67%	70%	73.33%
Muerte	0.33%	16.67%	0%	3.33%
No hay Formación	56.67%	36.67%	30%	23.33%

De manera general se pudo establecer que en ambos fotoperíodos se observó mayor formación de callo en WPM con respecto a MS. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Debnath (2004), Debnath (2006); TingTing & ZhouPing (2010), emplearon WPM para la propagación y organogénesis de especies del género *Vaccinium*, logrando formación de callos a partir de yemas axilares y organogénesis indirecta a partir de epitelios, respectivamente. Los autores indican que WPM es ideal para cultivo *in vitro* de plantas leñosas y muy utilizado en *V. floribundum* (Hoskovec, 2017).

Otro punto por analizar es que en oscuridad hubo 3.33% mayor formación de callos con respecto a los explantes expuestos a fotoperíodo. Los resultados obtenidos concuerdan con lo publicado por Scalzo *et al.* (2016), donde indican que la formación de callo organogénico en *Vaccinium* se ve favorecida por la exposición a poca intensidad luminosa.

En la Figura 23 se puede observar una hoja de mortiño con callo organogénico en formación, la imagen corresponde al tratamiento 7 con WPM, tomada a los 40 días.



Figura 23. Callo en formación

Por otro lado, en la Figura 24, se evidencia el desarrollo del callo organogénico a lo largo de la superficie de la hoja, transcurridos 60 días de cultivo.

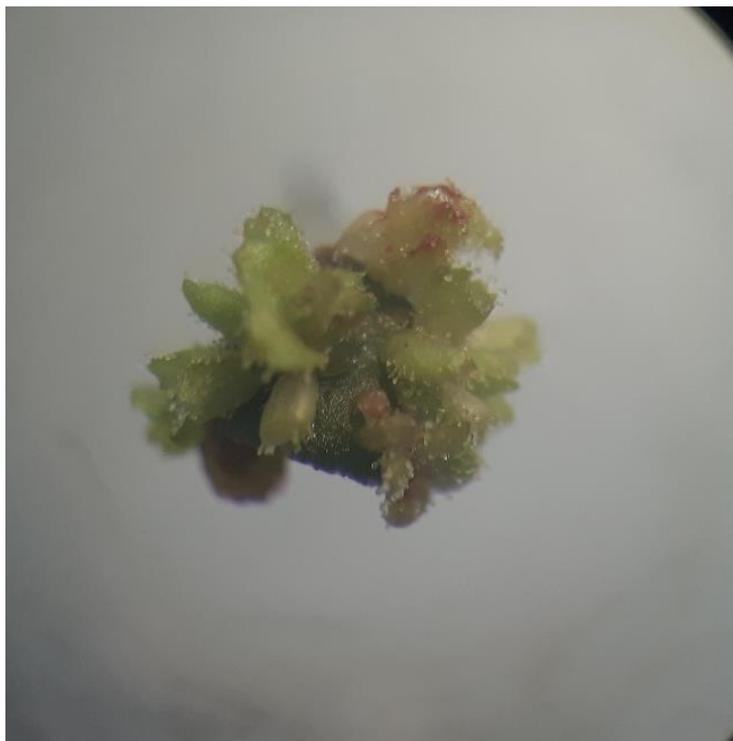


Figura 24. Callo organogénico formado en la superficie de la hoja

5.1.6 Porcentaje de formación de callo

Los resultados obtenidos del crecimiento del callo formado (Tabla 27) a los 60 días fueron: Para el factor 1 (M), el mayor porcentaje de formación de callo se observó en WPM tanto en luz como en oscuridad (25.83 y 35.83%, respectivamente), sin embargo, se pudo observar que la formación de callos en fotoperíodo en WPM fue ligeramente superior a MS, alrededor del 4% de diferencia, pero en oscuridad la diferencia fue del doble (15.83% respecto a 35.83%). Seguido del factor 2 (H), los resultados arrojaron que la hormona que mayor porcentaje de formación de callos fue TDZ en luz y en oscuridad (42.50 y 36.50%). Finalmente, para el tercer factor (D), se obtuvo como resultado que la mejor respuesta generó la dosis alta con valores de 25 y 33.33 para luz y oscuridad, respectivamente.

Para las 3 interacciones de primer orden, se compararon los tratamientos en 2 fotoperíodos. La primera interacción MxH a los 60 días (Tabla 27), nos indica que WPM + TDZ presentó porcentajes de formación de callo superiores con

respecto a los otros tratamientos, con valores de 45 y 65%, respectivamente. Por otro lado, la interacción MxD, nos reveló que WPM + 3 mg L⁻¹ obtuvo mejor respuesta en comparación a los otros tratamientos (55 y 61.67%, respectivamente). Finalmente, los resultados obtenidos de la tercera interacción HxD, revelaron que TDZ + 3 mg L⁻¹ tuvo porcentajes de formación superiores con valores de (50 y 42.5%, respectivamente).

De los resultados obtenidos se pudo inferir que el mejor tratamiento para la inducción de callos fue WPM + TDZ + 3 mg L⁻¹, ya que tuvo los porcentajes de formación más altos con respecto a los demás tratamientos con valores de 60 y 70%, respectivamente. Es importante mencionar que la inducción de callos en fotoperíodo 2 fue relativamente superior (10%), respecto a fotoperíodo 1, en el tratamiento antes mencionado estos resultados se acercan a lo reportado por Scalzo et al., (2016), el cual manifiesta que existe una influencia en la intensidad de la luz, el medio de cultivo y en el genotipo del explante; aunque las diferencias no fueron tan marcadas si se pudo observar que los tratamientos en oscuridad tendían a formar callo más rápido a diferencia del tratamiento con luz, lo que sugiere que la planta al estar sometida a un estrés de oscuridad, busca la manera de desarrollarse rápidamente para realizar fotosíntesis (Taiz et al., 2006). Es importante mencionar que para el presente estudio no se tomó en cuenta el genotipo del explante ya que se desconocía su procedencia, sin embargo, esto nos da una pauta para futuras investigaciones con nuevos materiales.

Tabla 27

ANOVA de la formación de callos a los 60 días, en fotoperíodo y en oscuridad.

Factores	Código	Formación callo Luz (%)	Formación callo Oscuridad (%)
M	1/2 Murashige & Skoog (MS)	21.67 ± 31.58 a	15.83 ± 20.50 b
	Woody Plant Medium (WPM)	25.83 ± 31.82 a	35.83 ± 33.27 a
H	Thidiazuron (TDZ)	42.50 ± 34.51 a	36.25 ± 40.13 a
	Zeatina (ZEA)	18.75 ± 31.28 b	15.50 ± 18.32 b
	Trans-Zeatina (TZR)	10.00 ± 17.01 b	23.75 ± 22.18 ab
D	Alta	25.00 ± 34.11 a	33.33 ± 28.87 a
	Baja	22.50 ± 28.88 a	18.33 ± 27.80 b
M x H	1/2 MS + TDZ	40.00 ± 35.75 ab	7.50 ± 16.87 b
	1/2 MS + ZEA	15.00 ± 31.62 bc	20.00 ± 22.97 b
	1/2 MS + TZR	10.00 ± 17.48 c	20.00 ± 19.72 b
	WPM + TDZ	45.00 ± 34.96 a	65.00 ± 35.75 a
	WPM + ZEA	22.50 ± 32.17 abc	15.00 ± 12.91 b
	WPM + TZR	10.00 ± 32.17 c	27.50 ± 23.72 b
M x D	1/2 MS + Alta	20.00 ± 28.66 a	5.00 ± 10.35 b
	1/2 MS + Baja	23.33 ± 34.68 a	26.67 ± 22.09 a
	WPM + Alta	55.00 ± 29.88 a	61.67 ± 33.36 a
	WPM + Baja	26.67 ± 34.68 a	40.00 ± 33.81 a
H x D	TDZ + Alta	50.00 ± 37.27 a	42.50 ± 39.18 a
	TDZ + Baja	35.00 ± 31.62 ab	30.00 ± 42.16 abc
	ZEA + Alta	20.00 ± 32.91 bc	10.00 ± 12.91 c
	ZEA + Baja	17.50 ± 31.39 bc	25.00 ± 20.41 abc
	TZR + Alta	12.50 ± 17.68 bc	15.00 ± 17.48 bc
	TZR + Baja	7.50 ± 16.87 c	32.50 ± 23.72 a
M x H x D	0.5 MS + TDZ + Alta	40.00 ± 31.91 ab	0.00 ± 0.00 e
	0.5 MS + TDZ + Baja	40.00 ± 31.91 ab	15.00 ± 22.36 cde
	0.5 MS + ZEA + Alta	0.00 ± 0.00 c	5.00 ± 11.18 de
	0.5 MS + ZEA + Baja	30.00 ± 41.08 abc	35.00 ± 22.36 bc
	0.5 MS + TZR + Alta	20.00 ± 20.92 bc	10.00 ± 13.69 cde
	0.5 MS + TZR + Baja	0.00 ± 0.00 c	30.00 ± 20.92 cd
	WPM + TDZ + Alta	60.00 ± 37.91 abc	70.00 ± 32.60 ab
	WPM + TDZ + Baja	30.00 ± 27.39 abc	60.00 ± 41.83 ab
	WPM + ZEA + Alta	40.00 ± 31.91 ab	15.00 ± 13.69 cde
	WPM + ZEA + Baja	5.00 ± 11.18 bc	15.00 ± 13.69 cde
	WPM + TZR + Alta	5.00 ± 11.18 bc	20.00 ± 20.92 cde
	WPM + TZR + Baja	15.00 ± 22.36 bc	35.00 ± 28.50 bc

En la Figura 26 (a, b y c) se puede observar el tratamiento que presentó los porcentajes más altos de formación de callos de mortño a partir de hoja, a los 60 días de incubación, con fotoperíodo 1.

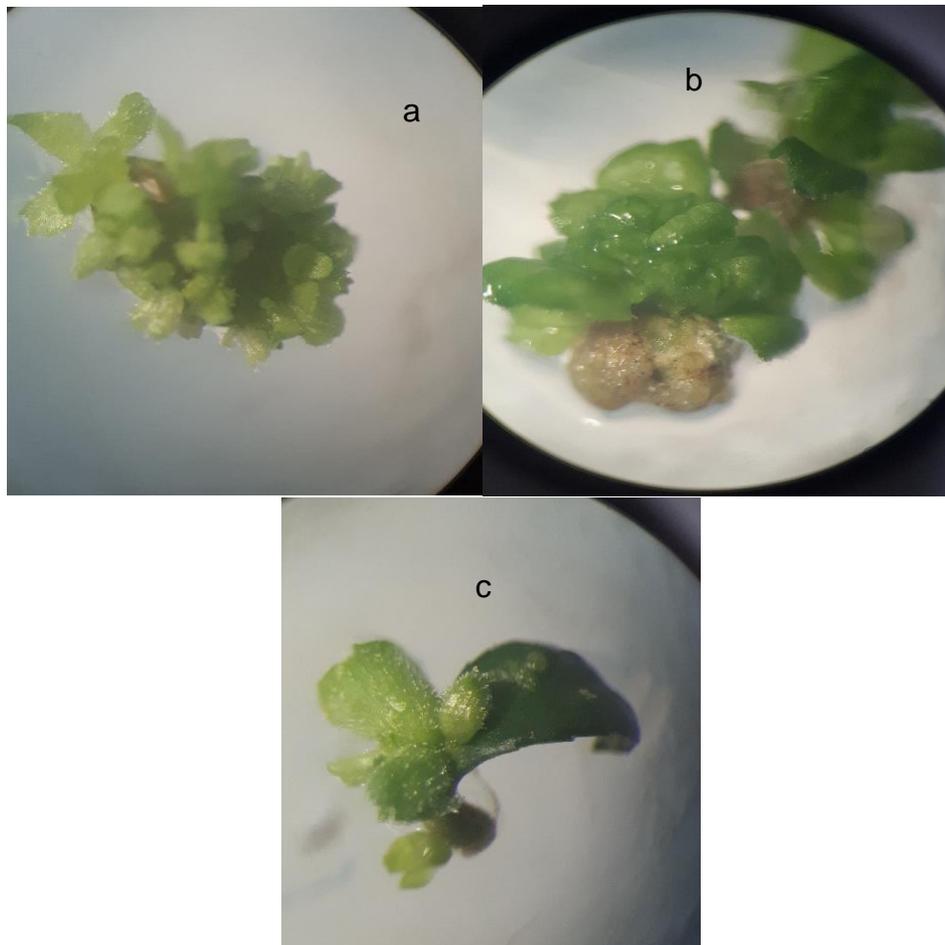


Figura 25. Tratamiento WPM + TDZ + 3 mg l^{-1}

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Del estudio se concluye que es posible inducir callos a partir de hojas provenientes de *vitro* plantas de mortiño.

El mayor porcentaje de formación de callos se obtuvo con el t7 que contiene WPM + TDZ + 3 mg L⁻¹, con valores de (60% en luz y 70% oscuridad).

El TDZ (citoquinina) en dosis alta (3 mg L⁻¹) fue el biorregulador más importante en el desarrollo de callos de mortiño a partir de *vitro* plantas.

El mejor medio de cultivo para la formación de callos fue Woody Plant Medium a una concentración de 2.2 g L⁻¹, enriquecido con 30 g L⁻¹ de sucrosa y 3 mg L⁻¹ de hormona en fotoperíodo 2.

6.2 Recomendaciones

Ampliar el tiempo de incubación de los explantes a 90 días, ya que existen evidencias científicas que se puede incrementar el número de callos, debido a la variabilidad genética del material en estudio.

Sería importante evaluar la interacción WPM x TDZ x Auxinas (IBA, 2iPo ANA) en dosis altas para mejorar la producción de callos.

Estudiar la respuesta en la formación de callos a partir de hojas, considerando la posición del explante, es decir, el envés de la hoja tenga contacto directo con el medio de cultivo, ya que puede facilitar la absorción y distribución de los compuestos en la hoja.

REFERENCIAS

- Azofeita, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 1(Centro de Investigación en Granos y Semillas CIGRAS), 153-175. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 de http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n01_153.pdf
- Benson, E. E. (2000). *In vitro Plant Recalcitrance: An Introduction. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 36(3), 141–148. Recuperado el 11 de Noviembre de 2018 de <http://www.jstor.org/stable/4293329>
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). *Micropropagation*. In S. S. Bhojwani & P. K. Dantu (Eds.), *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* (Springer, pp. 245–274). India: Springer India. Recuperado el 12 de Agosto del 2018 de https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_17
- Brenes, A., Matamoros, R., & Gómez, L. (2015). Micropropagación de cuatro cultivares de arándanos (*Vaccinium* spp.) a partir de segmentos foliares de dos procedencias. *Agronomía Costarricense*, 39(1), 7–23. Recuperado el 11 de noviembre del 2018 de <https://doi.org/10.1055/s-0028-1097966>
- Castro, C., Olarte, Y., Rache, L., & Pacheco, J. (2015). *Development of a germination protocol for blueberry seeds (Vaccinium meridionale Swartz)*. *Agronomia Colombiana*, 30(2), 196–203. Recuperado el (2018-06-18) de <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v30n2/v30n2a06.pdf>
- Chaparro, M. L., & Becerra, N. (1999). Anatomía del fruto de *Vaccinium floribundum* (Ericaceae). *Acta Biológica Colombiana*; Vol. 4, Núm. 1 (1999). Recuperado el 07 de Octubre de 2018 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/25867/28538>
- Coba, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M. F., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). Estudio Etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja. Revista de Ciencias de La Vida*, 8(2), 17–24. Recuperado el 22 de Junio de 2018 de <http://www.redalyc.org/pdf/4760/476047400002.pdf>

- Coba Santamaría, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M. F., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). *Ethnobotanical Study of the Mortiño (Vaccinium floribundum) as Ancestral and Potentially Functional Meal*. La Granja, 16(2), 5. Recuperado el 07 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.17163/lgr.n16.2012.01>
- Cobo, M. M., Gutiérrez, B., & de Lourdes Torres, M. (2018). *Regeneration of mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) plants through axillary bud culture*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 54(1), 112–116. Recuperado el 08 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9884-3>
- Cobo, M. M., Gutiérrez, B., & Torres, M. de L. (2018). *Regeneration of mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) plants through axillary bud culture*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 54(1), 112–116. Recuperado el 8 de Agosto de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9884-3>
- Debnath, S. (2004). *In Vitro Culture of Lowbush Blueberry (Vaccinium angustifolium Ait.)*. *Small Fruits Review*, 3(3–4), 393–408. Recuperado el 08 de Agosto de 2018 de https://doi.org/10.1300/J301v03n03_16
- Debnath, S. (2005a). *A two-step procedure for adventitious shoot regeneration from in vitro-derived lingonberry leaves: Shoot induction with TDZ and shoot elongation using zeatin*. *HortScience*, 40(1), 189–192. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 de <http://hortsci.ashspublications.org/content/40/1/189.full.pdf>
- Debnath, S. (2005b). *Effects of carbon source and concentration on development of lingonberry (Vaccinium vitis-idaea L.) shoots cultivated in vitro from nodal explants*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41(2), 145–150. Recuperado el 20 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1079/IVP2004590>
- Debnath, S. (2005c). *Micropropagation of lingonberry: Influence of genotype, explant orientation, and overcoming TDZ-induced inhibition of shoot elongation using zeatin*. *HortScience*, 40(1), 185–188. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 de

<http://hortsci.ashspublications.org/content/40/1/185.full.pdf>

- Debnath, S. (2006). *Zeatin overcomes thidiazuron-induced inhibition of shoot elongation and promotes rooting in strawberry culture in vitro*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81(3), 349–354. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1080/14620316.2006.11512072>
- Debnath, S. (2007a). *Influence of indole-3-butyric acid and propagation method on growth and development of in vitro- and ex vitro-derived lowbush blueberry plants*. *Plant Growth Regulation*, 51(3), 245–253. Recuperado el (2018-10-01) de <https://doi.org/10.1007/s10725-006-9164-9>
- Debnath, S. (2007b). *Propagation of Vaccinium in Vitro*. *International Journal of Fruit Science*, 6(2), 47–71. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 de https://doi.org/doi:10.1300/J492v06n02_04
- Debnath, S. (2018). *Thidiazuron in Micropropagation of Small Fruits BT - Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*. In N. Ahmad & M. Faisal (Eds.) (pp. 139–158). Singapore: Springer Singapore. Recuperado el 11 de Noviembre de 2018 de https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_6
- Debnath, S., & McRae, K. B. (2005). *A One-Step In Vitro Cloning Procedure for Cranberry (Vaccinium macrocarpon Ait.)*. *Small Fruits Review*, 4(3), 57–75. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 de https://doi.org/10.1300/J301v04n03_05
- Diamond, J. (2002). *Evolution, consequences and future of plant and animal domestication*. *Nature* (Vol. 418). Recuperado el 23 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1038/nature01019>
- Doménech, G. (2012). *Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica*. Universidad Politecnica de Valencia, 3,4. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 de [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/11526/Microsoft Word - art%EDculo docente cgisbert sept2010.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/11526/Microsoft%20Word%20-%20art%EDculo%20docente%20cgisbert%20sept2010.pdf?sequence=1)
- Fernández, D., Freire, E., & Peñafiel, M. (2015). *Catálogo de especímenes tipo del Herbario Nacional del Ecuador (QCNE)*, Museo Ecuatoriano de

- Ciencias Naturales. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 7(1), 39–87. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 de <http://revistas.usfq.edu.ec/index.php/avances/article/view/227/228>
- Franz, X. (2017). *Vaccinium floribundum* 6.jpg. Recuperado el (2018-10-22) de https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Vaccinium_floribundum_6.jpg&oldid=274468928&uselang=es#/media/File:Vaccinium_floribundum_6.jpg
- Fuller, D. Q. (2007). *Contrasting Patterns in Crop Domestication and Domestication Rates: Recent Archaeobotanical Insights from the Old World*. *Annals of Botany*, 100(5), 903–924. Recuperado el 25 de Noviembre de 2018 de <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm048>
- Himedia Plantigen. (2017). *Murashige and Skoog Medium With Calcium Chloride and Vitamins Without Sucrose and Agar Product Code: PT021 Please refer disclaimer overleaf*, 21–22. Recuperado el 12 de Diciembre de 2018 de www.himedialabs.com
- Hoskovec, L. (2017). *Vaccinium floribundum* Kunth – arándano. Recuperado el (2018-10-27) de <https://botany.cz/cs/vaccinium-floribundum/>
- Jaakola, L., Tolvanen, A., Laine, K., & Hohtola, A. (2001). *Effect of N6-isopentenyladenine concentration on growth initiation in vitro and rooting of bilberry and lingonberry microshoots*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66(1), 73–77. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1023/A:1010602726215>
- Jiménez, V., & Abdelnourl, A. (2018). Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguineum*) *Micropropagation protocol for a native blueberry from Costa Rica (Vaccinium consanguineum)* Palabras clave. *Tecnología En Marcha*. *Tecnología En Marcha*, 31(1). Recuperado el 20 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.18845/tm.v31i1.3504>
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *Fisiología Vegetal*, 15(XV), 1–28. Recuperado el 11 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/v150806>
- Kumari, A., Baskaran, P., & Van Staden, J. (2017). *In vitro propagation via*

organogenesis and embryogenesis of Cyrtanthus mackenii: a valuable threatened medicinal plant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 131(3), 407–415. Recuperado el 12 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1293-5>

- La Rosa, R., Sánchez, M., & Pérez, E. (2017). *Internal morphology and histology of blueberry Vaccinium corymbosum L. (Ericaceae) in Lima, Peru*. *Agronomía Colombiana*. Recuperado el 01 de Noviembre de 2018 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652017000200176&nrm=iso.
- Letham, D. S. (1973). Cytokinins from *Zea mays*. *Phytochemistry*, 12(10), 2445–2455. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80453-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80453-4)
- Liu, C., Callow, P., Rowland, L. J., Hancock, J. F., & Song, G. qing. (2010). *Adventitious shoot regeneration from leaf explants of southern highbush blueberry cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103(1), 137–144. Recuperado el 11 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9755-z>
- Llvisaca, S., Manzano, P., Ruales, J., Flores, J., Mendoza, J., Peralta, E., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2018). *Chemical, antimicrobial, and molecular characterization of mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) fruits and leaves. Food Science & Nutrition*, 6(4), 934–942. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1002/fsn3.638>
- Lloyd, G., & McCown, B. (1980). *Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society*, 30, 421–427.
- López-Escamilla, A. L., López-Herrera, M., & Loaiza-Alanís, C. (2016). Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo in vitro de plántulas de *Echinocactus platyacanthus link et otto (cactaceae)*. *Polibotánica*. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682016000200153&nrm=iso.

- Lu, Y., & Xu, J. (2015). *Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? Trends in Plant Science*, 20(5), 273–282. Recuperado el 11 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.006>
- Luteyn, J. L. (2002). *Diversity, Adaptation, and Endemism in Neotropical Ericaceae: Biogeographical Patterns in the Vaccinieae. The Botanical Review*, 68(1), 55–87. Recuperado el 09 de Noviembre de 2018 de [https://doi.org/10.1663/0006-8101\(2002\)068\[0055:DAAEIN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2002)068[0055:DAAEIN]2.0.CO;2)
- Magnitskiy, S., Ligarreto Moreno, G., & Lancheros, H. (2011). *Rooting of two types of cuttings of fruit crops Vaccinium floribundum Kunth and Disterigma alaternoides (Kunth) Niedenzu (Ericaceae)*. *Agronomía Colombiana; Vol. 29, Núm. 2 (2011)*. Recuperado el 12 de Diciembre de 2018 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/20621>
- Martin, D., Cárdenas, O., & Pacheco, J. (2012). Sustancias utilizadas como agente gelificante alternativas al agar en medios de cultivo para propagación in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 3, 3–5. Recuperado el 11 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/https://doi.org/10.22490/21456453.972>
- Mena, P., Hofstede, R., & Segarra, P. (2011). Los páramos ecuatorianos. Quito, Ecuador. Recuperado el 09 de Noviembre de 2018 de [http://beisa.dk/Publications/BEISA Book pdfer/Capitulo 06.pdf](http://beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2006.pdf)
- Mroginski, L., Sansberro, P., & Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In *Biotechnología y Mantenimiento Vegetal (ArgenBio, pp. 17–22)*.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. Recuperado el 06 de Junio de 2018 de <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Novikova, T. I., & Zaytseva, Y. G. (2018). *TDZ-Induced Morphogenesis Pathways in Woody Plant Culture BT - Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*. In N. Ahmad & M. Faisal (Eds.)

- (pp. 61–94). Singapore: Springer Singapore. Recuperado el 09 de Septiembre de 2018 de https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_3
- Ostrolucká, M. G., Libiaková, G., Ondrušková, E., & Gajdošová, A. (2004). *In vitro propagation of Vaccinium species*. Nitra, Slovak Republic.
- Prencipe, F. P., Bruni, R., Guerrini, A., Rossi, D., Benvenuti, S., & Pellati, F. (2014). *Metabolite profiling of polyphenols in Vaccinium berries and determination of their chemopreventive properties*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 89, 257–267. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.11.016>
- Racines, M. (2016). Domesticación de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth): frutal andino con gran potencial para la industria alimenticia. *Agronomía Colombiana*, 34, 51–53. Recuperado el 20 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58296>
- Rezali, N. I., Jaafar Sidik, N., Saleh, A., Osman, N. I., & Mohd Adam, N. A. (2017). *The effects of different strength of MS media in solid and liquid media on in vitro growth of Typhonium flagelliforme*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(2), 151–156. Recuperado el 10 de Octubre de 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.11.019>
- Sanjinés, A., Øllgaard, B., & Balslev, H. (2006). Algunos frutos comestibles de los Andes Centrales. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 329–346. Recuperado el 09 de Septiembre de 2018 de <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA Book pdfer/Capitulo 21.pdf>
- Scalzo, J., Donno, D., Miller, S., Ghezzi, M., Mellano, M., Cerutti, A., & Beccaro, G. (2016a). Effect of genotype, medium and light on in vitro plant proliferation of *Vaccinium* spp. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 44(4), 231–246. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1080/01140671.2016.1206946>
- Scalzo, J., Donno, D., Miller, S., Ghezzi, M., Mellano, M. G., Cerutti, A. K., & Beccaro, G. L. (2016b). *Effect of genotype, medium and light on in vitro plant proliferation of Vaccinium spp*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 44(4), 231–246. Recuperado el 19 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1080/01140671.2016.1206946>

- Schreckinger, M. E., Wang, J., Yousef, G., Lila, M. A., & Gonzalez de Mejia, E. (2010). *Antioxidant Capacity and in Vitro Inhibition of Adipogenesis and Inflammation by Phenolic Extracts of Vaccinium floribundum and Aristotelia chilensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 8966–8976. Recuperado el 11 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1021/jf100975m>
- Sigma-Aldrich. (2018a). Kinetin BioReagent, plant cell culture tested, amorphous powder | Sigma-Aldrich. Recuperado de 14 de Noviembre de 2018 de <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/k3378?lang=en®ion=EC>
- Sigma-Aldrich. (2018b). *Thidiazuron plant cell culture tested, BioReagent | Sigma-Aldrich*. Recuperado el 14 de Noviembre de 2018 de <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p6186?lang=en®ion=EC>
- Smith, R. (2013). *Plant Tissue Culture: techniques and experiments*. (Department of Horticulture, Vegetable Crops Improvement Center, Texas A&M University, & T. College Station, Eds.), *Plant Tissue Culture* (Third Edit). Amsterdam; Boston: ELSEVIER. Recuperado el 21 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415920-4.01001-X>
- Sujarwo, W., Arinasa, I. B. K., Caneva, G., & Guarrera, P. M. (2016). *Traditional knowledge of wild and semi-wild edible plants used in Bali (Indonesia) to maintain biological and cultural diversity*. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 150(5), 971–976. Recuperado el 11 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1080/11263504.2014.994577>
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I., & Murphy, A. (2006). *Plant Physiology*. In L. A. University of California (Ed.), *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences (Fifth)*. Sunderland, Massachusetts USA: Sinauer Associates, Inc. Recuperado el 12 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11130-3>

- Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K., Komatsu, H., ... Kunitake, H. (2008). *Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars*. *Scientia Horticulturae*, 119(1), 72–74. Recuperado el 01 de Noviembre de 2018 de <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.06.028>
- Thorpe, T. A. (2007). *History of plant tissue culture*. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169–180. Recuperado el 12 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>
- TingTing, H., & ZhouPing, S. (2010). *Callus induction and plant regeneration of Vaccinium angustifolium leaves*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 30(3), 615–620.
- Torres, M., Trujillo, D., & Venancio, A. (2010). Cultivo *in vitro* del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 2, 9–15.
- Vasco, C. (2009). Phenolic Compounds in Ecuadorian Fruits. *Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Food Science*, (16), 1204–1212. Recuperado el 12 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5018.1840>
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009). *Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (Vaccinium floribundum kunth)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8274–8281. Recuperado el 12 de Diciembre de 2018 de <https://doi.org/10.1021/jf9013586>

