



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTABLECIMIENTO IN VITRO DEL FRUTAL ANDINO MORTIÑO (*Vaccinium  
floribundum Kunth*) PARA LA APLICACIÓN DE AGROTECNOLOGÍAS DE  
MULTIPLICACIÓN ACELERADA

Autora

Fernanda Paola Dueñas Mendoza

Año  
2017



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DEL FRUTAL ANDINO MORTIÑO (*Vaccinium floribundum* Kunth) PARA LA APLICACIÓN DE AGROTECNOLOGÍAS DE MULTIPLICACIÓN ACELERADA

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

Profesor Guía

MSc. Pablo Santiago Moncayo Moncayo

Autor

Fernanda Paola Dueñas Mendoza

Año

2017

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, 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”

---

Pablo Santiago Moncayo Moncayo

Magister en Direcciones de Operaciones y Seguridad Industrial

C.C.1712367505

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Ricardo Javier Aguirre Jaramillo

Máster en Desarrollo e Innovación de Alimentos

C.C. 1712729829

## 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.”

---

Fernanda Paola Dueñas Mendoza

C.C. 1727177733

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por su sabiduría y fortaleza, a mis padres por su confianza, y sus consejos, que en varias ocasiones fueron los que me levantaron el ánimo, a mis hermanas por su apoyo incondicional, al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias por apoyarme en la realización de esta investigación, principalmente al Dr. Eduardo Morillo y al Ing. Santiago Meneses, a mi director de carrera Pablito Moncayo por haber sido una persona de importancia a lo largo de mi carrera universitaria.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi abuelito Bolívar Mendoza, que aunque ya no esté físicamente conmigo, en mi corazón y en mi mente lo llevo siempre presente.

## RESUMEN

En el presente trabajo de titulación se logró establecer material vegetal *in vitro* de semillas y brotes, partiendo de mortiño *Vaccinium floribundum* Kunth. Para el establecimiento *in vitro* de semillas, se probaron distintas variables que influyen en la germinación, tales como medio de cultivo, fotoperiodo y temperatura, obteniendo los mejores resultados que son de T3 (MS + 24 horas luz + 18°C) y T7 (WPM + 24 horas luz + 18°C), lo cual nos indica que las horas luz, y temperatura son el factor más influyente sobre la germinación, mientras que los medios de cultivo si difieren, dado a que las plántulas generadas en el medio de cultivo WPM presentaron mayor vigorosidad, para realizar la desinfección de estas semillas se utilizó un protocolo ya reportado en el 2010 por Torres *et al*, en el cual se siguió el siguiente procedimiento: Se realizó una desinfección con alcohol al 70 % por tres minutos, se hizo un enjuague con agua destilada estéril por una ocasión, se desinfectó con hipoclorito de sodio al 2.5% mas Tween 20 por 10 minutos, y por último se realizó un enjuague con agua destilada estéril por cinco ocasiones, las semillas previamente desinfectadas fueron sembradas en cajas Petri (20 por cada caja), en los medios de cultivo en estudio.

Para brotes se experimentaron distintos protocolos de desinfección, obteniendo el mejor resultado para T2 (Con desinfección previa + alcohol 70% por 1 minuto + NaClO 2% por 20 minutos), los brotes ya desinfectados fueron sembrados en tubos de ensayo con medio de cultivo WPM, para determinar los brotes que quedarían establecidos, se analizaron variables como contaminación, oxidación y número de brotes viables. Finalmente para hojas no se obtuvieron resultados debido a la edad del explante, ya que para este ensayo se utilizaron hojas de plantas adultas, y por ello las hojas sufrieron oxidación y murieron, por lo cual no hubo formación de callo. Para el análisis estadístico utilizado en esta investigación se utilizó un DCA en arreglo factorial, y para las pruebas de significancia LSD Fisher.



## ABSTRACT

In the present titling work, it was possible to establish *in vitro* vegetative material from seeds and shoots of mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*). For the *in vitro* establishment of seeds, different variables that influence in germination were tested, such as growth medium, photoperiod and temperature. The best treatments were T3 (MS + 24 hours light + 18°C) and T7 (WPM + 24 hours light + 18°C), which indicates that light hours, and temperature are the most influential factor in germination. Another important factor was the growth medium, the seedlings cultivated in WPM medium presents a higher vigor than the others plants. For the disinfection of seeds a reported protocol in 2010 by Torres et al. Was used, the following procedure were applied it starts with a disinfection in 70% for three minutes, then the material were rinsed with Sterile distilled water, later it was disinfected with 2.5% sodium hypochlorite plus Tween 20 for 10 minutes, finally it rinsed with sterile distilled water for five times. For this study the previously disinfected seeds were planted in Petri dishes (20 per box) with different growth mediums. For the seedlings different disinfection protocols were tested, the best treatment was T2 (With pre-disinfection + 70% alcohol for 1 minute + 2% NaClO for 20 minutes), the disinfected seedlings were seeded in sample tubes with WPM, to determine the best conditions for seedlings different variables such as contamination, oxidation and number of viable shoots were analyzed. Finally for leaves no results were obtained due to the age of the explant, since for this test leaves of adult plants were used this leaves underwent oxidation and died, also there wasn't a callus formation. For the statistical analysis the data were evaluated with a randomized block desing with factorial arrangement and LSD Fisher significance tests.

# ÍNDICE

<b>1. CAPÍTULO I.</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Justificación .....	1
1.3. Alcance .....	2
1.4. Objetivos .....	3
1.4.1. Objetivo General: .....	3
1.4.1. Objetivos Específicos:.....	3
1.5. Hipótesis .....	3
<b>2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO</b> .....	4
2.1. El mortiño .....	4
2.2. Descripción botánica .....	5
2.2.1. Hoja .....	5
2.2.2. Flor.....	5
2.2.3. Fruto .....	6
2.3. Usos para la agroindustria .....	6
2.3.1. Qué es la Biotecnología? .....	7
2.3.2. Cultivo de tejidos.....	7
2.3.3. Cultivo de tejidos en la agroindustria .....	7
2.3.4. Establecimiento <i>in vitro</i> de mortiño ( <i>Vaccinium floribundum</i> ).....	7
<b>3. CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO</b> .....	12
3.1. Materiales .....	12
3.2. Metodología .....	14
<b>4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	26
4.1. Ensayo 1: Establecimiento <i>in vitro</i> de semillas de mortiño... 26	
4.2.2. Análisis de fuentes de variación (oxidación) .....	32
3.2.3. Análisis de fuentes de variación (brotes viables) .....	34
4.3. Ensayo 3: Inducción de callos a partir de tejido foliar.....	36
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	37

5.1. Conclusiones.....	37
5.2. Recomendaciones .....	38
<b>REFERENCIAS</b> .....	40
<b>ANEXOS</b> .....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación entre tratamientos T7 (izquierda) y T3 (derecha).....	29
Figura 2. Comparación entre tratamientos T7 (izquierda) y T3 (derecha).....	29
Figura 3. Inicio y fin de germinación de semillas in vitro de mortiño. INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.....	30
Figura 4. Hoja oxidada y sin formación de callos (izq) hoja con formación de callos (der).....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas geográficas volcán Atacazo. ....	14
Tabla 2. Tratamientos para el establecimiento de semillas en condiciones in vitro. INIAP. Cutuglagua .Pichincha 2017.....	18
Tabla 3. Tratamientos para el establecimiento in vitro de brotes. INIAP. Cutuglagua, Pichincha 2017.....	20
Tabla 4. ADEVA para el ensayo del establecimiento in vitro de brotes. INIAP. Cutuglagua, Pichincha 2017. ....	21
Tabla 5. Tratamientos para la inducción de callos a partir de tejido foliar. INIAP. Cutuglagua, Pichincha 2017. ....	23
Tabla 6. ADEVA para el ensayo del inducción de callos a partir de tejido foliar. INIAP. Cutuglagua, Pichincha 2017.....	24
Tabla 7. Características del lugar.....	25
Tabla 8. Características del laboratorio.....	25
Tabla 9. Análisis de fuentes de variación de establecimiento de semillas in vitro de semillas de mortiño. INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.....	26
Tabla 10. Prueba LSD Fisher para comparación entre factores para el establecimiento in vitro de semillas de mortiño INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.....	27
Tabla 11. Promedios de germinación de semillas de mortiño a los 80 días. ....	27
Tabla 12. Análisis de fuentes de variación de contaminación. INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.....	30
Tabla 13. Prueba LSD Fisher para comparación entre factores (contaminación). INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.....	31
Tabla 14. Análisis de fuentes de variación de oxidación. INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.....	32
Tabla 15. Prueba LSD Fisher para comparación entre factores (oxidación). INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.....	33
Tabla 16. Análisis de fuentes de variación de brotes viables. INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.....	34
Tabla 17. Prueba LSD Fisher para comparación entre factores (brotes viables). INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.....	35

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

El mortiño es una planta leñosa endémica del Ecuador, perteneciente a la familia Ericaceae del género *Vaccinium*, la misma que se caracteriza por ser ramificada y puede llegar a medir 2,5 m de altura. Su fruto es una baya esférica que tiene un tamaño aproximado de 5 a 8 mm de diámetro y su color es azul o azul oscuro (Coba *et al.*, 2012).

Según los estudios realizados mencionan que existen dificultades para reproducir al mortiño por métodos sexuales y asexuales debido a que es una especie silvestre que aún no se ha podido domesticar y generar una tecnología eficiente para establecer cultivos comerciales que satisfagan la demanda interna, pero existen estudios en otras especies al mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), que nos sirven de referencia para comprender de mejor manera los problemas relacionados a la propagación, para lo cual, Castro en el 2012 menciona que para la geminación de semillas en *Vaccinium meridionale* es importante los factores como luminosidad y temperatura, así mismo, Gutiérrez en el 2011 cita a Magnitskiy y Ligarreto (2007), dicen que, la dificultad al momento de reproducir con semillas es su diminuto tamaño, distinta forma, dependencia de luz, temperatura para germinar u otros casos de latencia. Además Noboa en el 2010 menciona que no existe una amplia investigación en el Ecuador respecto a mortiño, Restrepo en el 2013, dice que la interacción de las hormonas con la planta dependen mucho de las concentraciones en las que se utilicen y Medina en el 2015, menciona que el crecimiento y adaptación de la planta de mortiño es muy larga, por lo cual ésta también puede ser una limitante para tener mayor reproducción.

### 1.2. Justificación

La multiplicación de *Vaccinium floribundum* Kunth presenta varias dificultades que no permiten la existencia de cultivos tecnificados de mortiño en Ecuador,

esto se debe a la baja viabilidad de las semillas y que la reproducción asexual es deficiente lo que genera no poseer plantas para tener cultivos que permitan satisfacer la demanda creciente de este fruto en los últimos tiempos debido a las propiedades antioxidantes que posee y su valor biológico, nutritivo y medicinal.

Además por el potencial agroindustrial que posee, es necesario desarrollar y mejorar las tecnologías que han sido reportadas y evaluar posteriormente la eficiencia y factibilidad para propagar este cultivo. Si se consigue tecnificar y potenciar este cultivo, no sólo se lo utilizará para la tradicional colada molada, sino que también se empezarán a crear e innovar nuevos productos con alto valor agregado no sólo para la industria, sino también para los consumidores que al crear y fomentar conciencia y así puedan consumir lo nuestro.

Para potenciar este cultivo el Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP y la UDLA plantean realizar ensayos de germinación, y ensayos de reproducción asexual al tomar yemas y hojas, estos ensayos serán una guía para establecer este material vegetal *in vitro*.

Con la finalidad de potenciar la multiplicación de mortiño, se plantea realizar la investigación al aplicar herramientas biotecnológicas de cultivo de tejidos para el establecimiento *in vitro* al utilizar como material vegetal de partida semillas, brotes y hojas, para disponer de material para evaluar posteriormente la aplicación de tecnologías de propagación acelerada en esta especie.

### **1.3. Alcance**

Esta investigación partirá desde resultados existentes sobre el crecimiento meristemático *in vitro* de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), información que será importante como punto de partida para mejorar los procedimientos y determinar los resultados que sean sobresalientes.

La primera fase de la investigación tendrá alcance sobre la introducción y

establecimiento del material vegetal, al tomar en cuenta los resultados conseguidos por Torres *et al* 2010. Como primer paso se tendrá la desinfección de semillas, brotes y hojas. Para semillas se analizarán factores como son el fotoperiodo, medios de cultivo y temperatura, para brotes, establecer un protocolo de desinfección para analizar contaminación, oxidación y número de brotes viables, y por último para hojas comprobar si se logra la inducción de callos. Finalmente ésta investigación llegará hasta obtener plántulas procedentes de la germinación y material vegetal establecido tanto de brotes y hojas, para que continúe la investigación en las etapas de micropropagación de las plantas. Para este estudio será importante desarrollar un diseño experimental, ya que se necesita registrar los datos anteriores más los actuales para poder compararlos entre sí y tener los mejores resultados para garantizar la continuación de la investigación a futuro.

#### **1.4. Objetivos**

##### **1.4.1. Objetivo General:**

- Optimizar y establecer material vegetal *in vitro* de mortiño a partir de diferentes tipos de explantes.

##### **1.4.1. Objetivos Específicos:**

- Evaluar la germinación *in vitro* de semillas de mortiño.
- Validar y optimizar un protocolo para la desinfección y el establecimiento *in vitro* de brotes vegetativos de plantas de mortiño.
- Evaluar la respuesta a la inducción de callos en mortiño a partir de explantes foliares.

#### **1.5. Hipótesis**

- **Hipótesis Nula:** Las tecnologías *in vitro* aplicadas no responden



eficientemente al establecimiento *in vitro* del material vegetal del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).

- **Hipótesis Alternativa:** Las tecnologías *in vitro* aplicadas si responden eficientemente al establecimiento *in vitro* del material vegetal del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).

## 1. CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

### 2.1. El mortiño

El mortiño es una planta leñosa endémica del Ecuador, perteneciente a la familia Ericaceae del género *Vaccinium*, esta especie crece de forma silvestre en las zonas en las que su altura oscila entre los 2500 y 4300 msnm, específicamente en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Bolívar, Cañar, Azuay, y Loja (Coba *et al.*, 2012).

El género *Vaccinium* tiene alrededor de 4500 especies alrededor del mundo, en Ecuador la que se puede encontrar de manera más abundante es *Vaccinium floribundum* Kunth que crece en distintas provincias de la Sierra, mientras que las especies *Vaccinium distichum* y *Vaccinium crenatum*, se las encuentra en las zonas de la Sierra Sur, en provincias como Loja y Azuay (Cobo, 2014).

Según Arteaga (2014), la planta de mortiño necesita para crecer de un clima frío-templado, con una temperatura entre 7-14°C, el suelo debe ser arenoso, húmifero y suelto, además que sus características húmedas deben ser de 60-80% y las ácidas con un pH de 4-5, estas condiciones son necesarias para crecer, además necesitan un buen drenaje ya que no soporta los encharcamientos.

Éste arándano (como también se le conoce, además de Uva de los Andes) es muy cotizado por sus distintas propiedades medicinales que posee, pero existe

la limitante de que en el Ecuador, no hay cultivos tecnificados ni comerciales, sino que crecen en pequeñas parcelas, en las que su fruto puede ser cosechado de forma más abundante en los meses de septiembre a diciembre, es decir solo hay una cosecha anual. Mientras que en otros países como Canadá y Estados Unidos el *blueberry* (misma especie pero diferente género) se lo puede consumir y comercializar en cualquier época del año (Arteaga, 2014).

## **2.2. Descripción botánica**

El mortiño es una planta arbustiva muy ramificada que dependiendo de la especie pueden llegar a medir entre 2 - 3 metros de altura, la especie en estudio (*Vaccinium floribundum*) mide 2,5 m (Coba *et al.*, 2012)

### **2.2.1. Hoja**

Sus hojas son muy pequeñas y simples, con su margen aserrado, tienen forma elíptica u ovalada, son de ápice agudo, base cuneada, envés glabro, y con el nervio primario hundido por el haz, presentan color verdoso, y su corteza se desprende con facilidad (Pérez *et al.*, 2007).

### **2.2.2. Flor**

Sus flores miden menos de 1 cm son de color rosado o rojo, su inflorescencia es en racimo, donde se pueden encontrar de 10 a 15 flores por cada racimo, y a su vez éstas pueden ser solitarias, presenta 5 lóbulos lanceolados, corola urceolada que generalmente es de color rosado o blanco, 5 lóbulos reflexos, posee entre 8 a 10 estambres. Existen dos floraciones al año, la primera que empieza de febrero a mayo, y la segunda que es desde septiembre a diciembre (Pérez *et al.*, 2007).

### 2.2.3. Fruto

Su fruto es una baya esférica que es de color verde cuando está en estado inmaduro y de color azul oscuro a casi negra en estado maduro, con un sabor astringente pero agradable, tiene un tamaño que puede llegar a medir entre 5 a 8 mm de diámetro. Tiene dos épocas de fructificación al año, la primera que no es tan abundante la cual es desde abril hasta mayo, a ésta se la conoce como mitaca, mientras que la cosecha más abundante es desde septiembre hasta diciembre (Pérez *et al.*, 2007).

### 2.3. Usos para la agroindustria

Los frutos del mortiño presentan por cada 100 gramos de fruta fresca, una cierta cantidad de azúcares solubles tales como glucosa 2.6 g y fructosa 4.4 g, entre los minerales tenemos calcio 0.12%, fósforo 0.09%, magnesio 0.06%, potasio 0.75%, sodio 0.09%, cobre 6 ppm, hierro 30ppm, manganeso 62 ppm, zinc 10 ppm, y componentes antioxidantes como ácido ascórbico 9 mg, contenido fenólico soluble total 882 mg, capacidad antioxidante 1200 mg Trolox, y antocianinas 5% (Arteaga, 2014). Por sus propiedades físico químicas presenta la ventaja de ser refrigerado sin alterar sus características organolépticas y nutricionales, sin variar el peso y volumen de la baya (Coba *et al.*, 2012).

Por las características antes mencionadas el mortiño tiene un gran potencial para la industria alimentaria existiendo la posibilidad de generar productos tales como: jugos, mermeladas, harinas, frutos deshidratados, coladas, ingredientes para pastelería y vino. En el Ecuador existe el interés de agroindustrializar este producto, un ejemplo es la elaboración de vino que se realiza desde el año 2010 en la provincia de Cotopaxi en el cantón Sigchos por la Asociación de Productores de Vinos de Mortiño quienes cada tres meses procesan 200 libras de mortiño (Revista Líderes, 2016), (GAD Sigchos, 2016).

### **2.3.1. Qué es la Biotecnología?**

La agrobiotecnología una tecnología que aplica conocimientos de algunas ciencias cuyo trabajo consiste en la aplicación de origen tecnológico que utiliza organismos vivos para crear procesos o productos que serán para un uso específico (Duque, 2010).

### **2.3.2. Cultivo de tejidos**

Dentro de las técnicas que se utilizan se encuentran los cultivos *in vitro* los cuales consisten en colocar un fragmento de planta que pueden ser: células, tejidos, semillas, brotes, hojas, pétalos, frutos o raíces, inducidos a crecer en soluciones nutritivas artificiales adicionadas generalmente con hormonas vegetales, en condiciones asépticas para evitar que existan microorganismos. Cada una de las partes que se extraen de la planta tiene la capacidad de originar una planta idéntica de la que se tomó el fragmento (Gutiérrez, 2011).

### **2.3.3. Cultivo de tejidos en la agroindustria**

Gracias a la técnica mencionada anteriormente, se ha tomado esta alternativa para lograr la multiplicación de plantas de forma más rápida, rentable, y principalmente con la disponibilidad de material en cualquier época del año. El aspecto más importante para la utilización de esta técnica, es que permite garantizar la calidad de la planta, ya que su explante fue tratado previamente con su protocolo de desinfección, asepsia y los distintos medios de cultivo, además se sabe la procedencia exacta de la planta. Este conjunto de factores permiten tener un material viable y vigoroso para su posterior manipulación (Gutiérrez, 2011).

### **2.3.4. Establecimiento *in vitro* de mortiño (*Vaccinium floribundum*).**

Las plantas leñosas presentan varias dificultades al momento de realizar el establecimiento *in vitro*, esto se debe a que algunas de estas especies son

recalcitrantes, pero generalmente para esta técnica se ocupan tejidos juveniles ya que éstos han presentado mayor éxito, además de que influyen otros factores como la edad y tipo del tejido, el genotipo, y la época del año en la que se extrajo el explante (Torres *et al.*, 2010).

Otro problema que se ha analizado, es que estas especies suelen ser sensibles a las altas concentraciones de nutrientes que hay en los medios de cultivo, por lo que en el año de 1980 Lloyd y McCown elaboraron el Woody Plant Medium (WPM) al variar la concentración de ciertas sales (Torres *et al.*, 2010).

En el momento de realizar el establecimiento *in vitro* de cualquier tipo de planta hay una secuencia de pasos que se deben seguir para obtener un material para multiplicación de excelente calidad, dentro de estos pasos se tienen los siguientes:

- **Explantes:**

Se denomina explante a cualquier parte separada de un vegetal, este puede ser por ejemplo: célula, tejido, órgano, protoplasto, cualquiera de ellos pueden ser sembrados en un medio adecuado, el cual va a permitir la regeneración de plantas completas (Perla, 2007).

Uno de los pasos más importantes para el establecimiento de material *in vitro* es la elección del explante, ésta elección estará en función del objetivo que se ha planteado y de la especie vegetal que se utilizará (Perla, 2007). Pero los explantes que presentan mejores resultados son aquellos que se toman de plantas jóvenes, esto se debe a que su capacidad de regenerar órganos o tejidos (morfogénesis) es más rápido (Ramos, 2012).

Otro factor importante es el tamaño del explante, que éste también va a depender del objetivo planteado y de la especie vegetal en estudio. Si se toma en cuenta un explante grande puede ayudar y favorecer la proliferación callosa, pero una desventaja es que puede existir mayor contaminación por patógenos, mientras que si se escoge un explante pequeño la respuesta deseada puede

ser mínima. Hay que tomar en consideración otros factores que influyen además de los mencionados anteriormente, como los pretratamientos que se realicen a los explantes, la época del año en la que se realizó la colecta, y las condiciones de crecimiento de las plantas (Perla, 2007).

Dependiendo del tipo de material vegetal utilizado, la técnica de propagación *in vitro* a utilizarse puede ser de: Cultivo de órgano en los que se usan yemas axilares y apicales, además de los nudos en tallos, para el cultivo de tejidos se utilizan hojas, peciolo y meristemos, y por último para el cultivo de células se hace uso de células y protoplastos, a cada uno de ellos dependiendo del caso se les añaden los reguladores de crecimiento (Ramos, 2012).

- **Asepsia:**

Las condiciones físicas en las que se incuban los cultivos forman un ambiente adecuado para que exista la proliferación de microorganismos tales como hongos y bacterias, este tipo de microorganismos pueden destruir los medios de cultivo, competir con el explante, o llegar a modificar a los medios. Para que esta técnica sea exitosa se debe evitar la contaminación, y para lograrlo es necesario trabajar en ambientes adecuados, esterilizar los medios de cultivo, realizar desinfecciones de los explantes para liberarlos de microorganismos exógenos, y principalmente manejar de forma correcta las normas de asepsia (Perla, 2007).

- **Agentes desinfectantes:**

Dentro de los agentes desinfectantes es común el uso de etanol al 70%, de igual manera hipoclorito de sodio (NaOCl) en distintas concentraciones que varían del 1 al 3%, mientras que el hipoclorito de calcio (Ca(OCl))<sub>2</sub> del 6 al 12% y el cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) del 0,1 al 1,5% son usados en menor frecuencia. Dependiendo el caso es útil usar Tween-20 del 0,01 al 0,1% como agente tensoactivo, se lo puede mezclar sin tener ninguna reacción contraria con hipoclorito. (Perla, 2007).

Es necesario que todo el proceso de desinfección se lo realice en cámara de flujo laminar para mantener controladas las condiciones de asepsia, en el momento que se activa la luz UV, al desinfectar con alcohol el área de trabajo y todos los materiales que se utilizarán, se debe tomar en cuenta que el flujo de aire debe estar prendido todo el tiempo mientras se está haciendo uso de cámara.

Por último es importante tomar en cuenta que la desinfección debe ayudar a eliminar los microorganismos existentes, sin dañar el explante.

- **Medios de cultivo**

El objetivo principal que existe en la elaboración de medios de cultivo es suministrar los nutrientes, minerales en concentraciones adecuadas que son las que necesita la planta, para ello se deben incluir los macroelementos como son: C, H, O, N, K, P, S, Ca, Mg), y los microelementos los cuales son: Cl, Fe, B, Zn, Cu, Mo) (Ramos, 2012).

- **Sales**

Existen distintos medios de cultivo, pero cada medio debe ser utilizado según la especie de la planta, por ejemplo para las plantas leñosas el medio Murashige & Skoog (MS) es alto en sales, por lo cual provoca que los explantes presenten coloración oscura, mientras que el Woody Plant Medium (WPM), reduce este oscurecimiento (Azofeifa, 2009).

Cada compuesto cumple una función especial para la planta como por ejemplo el nitrógeno es el que se encarga de la síntesis de tejidos, el fósforo es el constituyente principal de varias coenzimas, además ayuda en la biosíntesis de lípidos, en el proceso de fotosíntesis, y en la síntesis de clorofila, el potasio es el que aumenta la actividad fotosintética, además ayuda en la regulación de la presión osmótica de la célula, y disminuye la transpiración, el calcio es el que

se encarga de mantener las células de la planta unidas, además de ayudar en el desarrollo de las raíces, y para finalizar el azufre contribuye con la regulación osmótica celular (Molina, 2012).

- **Carbohidratos**

La función que cumplen los carbohidratos en los medios de cultivo, es la fuente principal de energía para que se puedan realizar los procesos vitales de las células, y reguladores osmóticos (EcuRed). Para ello es indispensable agregar azúcares al medio, ya que éstos serán la fuente de energía. El azúcar que se usa generalmente es la sacarosa, pero también se puede utilizar glucosa, fructosa, maltosa, entre otros (Azofeifa, 2009).

- **Vitaminas**

Es necesario añadir vitaminas al medio ya que estas son las encargadas de realizar reacciones catalíticas en el metabolismo y se las puede utilizar en pequeñas cantidades, la más utilizada es la B1 (Tiamina) y es considerada la más esencial (Ramos, 2012).

- **Reguladores de crecimiento**

Cada uno de los reguladores de crecimiento aparte de influir en las respuestas de varias partes del vegetal, éstas dependen del órgano del vegetal, de sus concentraciones exógenas y endógenas, de la especie, además de condiciones ambientales (Ramos, 2012)

Existen algunas sustancias como las auxinas que tienen la capacidad de regular el crecimiento, división celular y diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro*, las citoquininas son derivadas de la adenina que promueven la división celular, las giberelinas son fitohormonas que también ayudan en el crecimiento de la planta, el ácido abscísico es un inhibidor de crecimiento, este se encarga



de reprimir la embriogénesis somática y disminuye la frecuencia de anomalías de desarrollo como pueden ser formación secundaria de embriones a partir de embriones somáticos y germinación precoz, y el etileno influye en distintos procesos como son: liberación de la dormancia, crecimiento, y diferenciación de brotes y raíces, formación de raíces adventicias, abscisión de hojas, flores y frutos, inducción de floración en ciertas plantas, senescencia de hojas, flores, además de maduración de frutos (Ramos, 2012).

- **Antioxidantes:**

Para evitar la oxidación del explante, Azofeifa en el 2009 recomienda que se añada al medio de cultivo antioxidantes ya que estos retardan o evitan dicha oxidación, de igual manera se pueden agregar al explante directamente sumergiéndolos en una solución ya preparada, los antioxidantes que han sido estudiados en la incorporación al medio de cultivo son Ácido Ascórbico (AA) y Ácido Cítrico (AC), éstos presentan una disminución considerable en la oxidación.

## **2. CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO**

### **2.1. Materiales**

Los materiales, equipos e insumos a utilizarse en este experimento se detallan a continuación:

Materiales de Laboratorio

- Frascos de vidrio 200 ml, 100 ml
- Tubos de ensayo
- Cajas Petri
- Probetas
- Pipetas

- Bisturís
- Pinzas
- Agitador
- Lámpara de alcohol
- Fósforos
- Guantes y mascarillas
- Mandil
- Papel servilleta
- Cinta rolopak
- Papel aluminio

#### Equipos de laboratorio

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

#### Reactivos

- Medio Murashige y Skoog (M&S)
- WoodyPlant Medium (WPM)
- Sucrosa
- Sacarosa
- Zeatina
- Trans-Zeatina

- 2ip
- TDZ
- Agua destilada
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de sodio
- Agar
- Alcohol
- Hipoclorito de Sodio
- Tween 20

Materiales y equipos de oficina

- Resmas de papel bond
- Computador
- Impresora
- Marcadores y lapiceros
- Cámara de fotos

### 3.2. Metodología

**Colecta:** Se siguieron las normas establecidas por el Ministerio del Ambiente (MAE) para tener acceso a este material.

Mencionado lo anterior, se inició con la recolección del material vegetal en la zona donde se encuentra ubicado el volcán Atacazo, en la parroquia de Cutuglagua, cantón Mejía, su ubicación geográfica se encuentra en la tabla 1.

Tabla 1.

*Coordenadas geográficas volcán Atacazo.*

<b>Nombre</b>	Atacazo - Ninahuilca
<b>Coordenadas</b>	0.361° S; 78, 62° W

<b>Altura</b>	4455 m snm
<b>Diámetro</b>	18 x 16 km
<b>Tipo de volcán</b>	Complejo volcánico
<b>Última erupción</b>	Hace aprox. 2300 años
<b>Estado</b>	Potencialmente activo

Tomado de: Instituto geofísico Escuela Politécnica Nacional, 2017

Para esta recolección se buscaron dos plantas grandes y tres plantas medianas para tener la gran mayoría de brotes, la extracción de estas plantas se las realizó con pan de tierra, para que éstas no sufran cambios tan bruscos y poder conservarlas en un entorno similar al de su hábitat, por esta razón a dos de ellas principalmente se las sembraron en el jardín, y a las tres plantas restantes se las sembró en macetas, ubicadas dentro del invernadero.

**Semilla:** Las semillas se las obtuvo al aplastar el fruto sobre una malla delgada, se colocó para secar a la luz de sol sobre papel, y al estar secas se procedió a observarlas bajo el estereomicroscopio para garantizar que la semilla tiene embrión, después se las separó y colocó en cajas Petri. Una vez que se obtuvo el material vegetal, se procedió a realizar la desinfección, en la que se aplicó hipoclorito de sodio (NaOCl 2%), alcohol etílico al 70%, Tween, y agua destilada, con el material previamente desinfectado, se realizaron las pruebas de germinación en semillas, para ello se aplicaron factores como luz y oscuridad, temperaturas frío y ambiente, y dos medios de cultivo como fueron Murashige&Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM).

**Brotes:** Los brotes que se tomaron de la planta fueron las yemas laterales para tener uniformidad. Para introducir los brotes, dependiendo del tipo de tratamiento se aplicaron desinfecciones previas en el cual se utilizaron fungicidas y antioxidantes, los cuales fueron ácido cítrico (200mg) y ácido ascórbico (200mg) por 60 minutos o para el otro tratamiento no se utilizó desinfección previa, además se procedió a realizar la desinfección con alcohol al 70%, e hipoclorito de sodio (NaOCl 2%). La evaluación que cada

determinado tiempo se evaluaron son factores como contaminación, números de brotes viables, y porcentaje de oxidación, el medio de cultivo en el que se sembraron estos brotes fue un WPM sin hormonas.

**Hojas:** Para sembrar las hojas se utilizó un medio de cultivo con tres tipos de hormonas las cuales fueron Tiadiazuron (TDZ), N<sup>6</sup>2 isopentenil- adenine (2iP), y Zeatina para esta sección evaluamos si se formó o no callos.

El método para el establecimiento *in vitro* de plantas de *V. floribundum* se basó en la desinfección del material vegetal de mortiño en estudio (semillas, brotes y hojas) en la que se realizaron limpiezas con diferentes agentes desinfectantes para eliminar los microorganismos que puedan competir con el desarrollo de los explantes en los medios de cultivo semisólidos. Así mismo se tomó en cuenta los factores como: tipo y edad del explante, la temperatura, el fotoperiodo y composición hormonal de los medios. Para el establecimiento *in vitro* de la planta de mortiño se realizaron los siguientes pasos y cada uno con sus procedimientos diferentes conforme a los objetivos planteados la metodología que se siguió se dividió en tres ensayos, así como se indica a continuación:

### **Ensayo 1: Establecimiento *in vitro* de semillas de mortiño.**

Las semillas fueron extraídas del fruto al ser aplastadas sobre un tamiz muy delgado y con abundante agua para poder separar las semillas de la pulpa y cáscara del fruto, éstas fueron colocadas sobre papel absorbente y se las dejó secar. Luego se las observó bajo el estereomicroscopio para comprobar que las semillas a utilizar en el ensayo tenían embrión, después se las lavó y se desinfectó las semillas que se colocaron en unas bolsitas de papel absorbente para realizar la desinfección de acuerdo al protocolo propuesto por Torres y colaboradores en el 2010 (Anexo 1).

Posteriormente en cámara de flujo laminar se abrieron las bolsitas con las

semillas desinfectadas y se las colocó en cajas Petri con los medios de cultivo en estudio. Después se evaluó porcentaje de germinación al tomar en cuenta factores como temperatura y luminosidad (Torres *et al.*, 2010; Castrao, 2012).

- **Factores de estudio:**

**Medios de cultivo (2)**

**m1** = Medio Murashige y Skoog (M&S)

**m2** = Woody Plant Medium (WPM)

**Fotoperiodos (2)**

**f1** = 16 horas luz (Castro, 2012)

**f2** = 24 horas luz (Castro, 2012)

**Temperatura (2)**

**c1** = 18°C (Castro, 2012)

**c2** = 28°C (Castro, 2012)

- **Variables:**

**Porcentaje de germinación (%):**

Se determinó el porcentaje de germinación de las semillas al momento de realizar la relación porcentual del número de semillas germinadas versus las no germinadas. Se evaluó cada 20 días hasta el final de la germinación.

**Inicio de la germinación (días):**

Se determinó el inicio de la germinación de las semillas con una revisión periódica hasta cuando comenzó el desarrollo del embrión de las primeras semillas.

### Final de la germinación (días):

Se determinó el final de la germinación de las semillas con una revisión periódica cuando terminó el desarrollo del embrión de las últimas semillas.

- **Unidad Experimental:**

La unidad experimental estuvo conformada por 20 semillas en una caja Petri con medio de cultivo en estudio.

- **Tratamientos:**

Tabla 2.

*Tratamientos para el establecimiento de semillas en condiciones in vitro. INIAP. Cutuglagua .Pichincha 2017.*

Tratamiento	Código	Descripción
t1	m1f1c1	MS + 16 horas luz + 18°C
t2	m1f1c2	MS + 16 horas luz + 28°C
t3	m1f2c1	MS + 24 horas luz + 18°C
t4	m1f2c2	MS + 24 horas luz + 28°C
t5	m2f1c1	WPM + 16 horas luz + 18°C
t6	m2f1c2	WPM + 16 horas luz + 28°C
t7	m2f2c1	WPM + 24 horas luz + 18°C
t8	m2f2c2	WPM + 24 horas luz + 28°C

**Nota:** Las letras que corresponden a los códigos, se colocaron de acuerdo a los factores de estudio.

- **Promedios:**

Se utilizó una tabla de promedios en la que se pudo evidenciar con claridad que tratamientos tuvieron los mejores porcentajes de germinación.

## **Ensayo 2: Establecimiento *in vitro* de brotes.**

**Muestreo y toma de material vegetal:** La toma de material vegetal de mortiño se realizó en plantas del páramo del volcán Atacazo en la Parroquia de Cutuglagua, cantón Mejía a una altura de 3440 msnm. Para la toma de explantes se consideró la sanidad y vigorosidad de las plantas.

Los explantes se extrajeron de los brotes con yemas laterales con un tamaño promedio entre 2-3cm de altura, que fueron llevadas al laboratorio para someterlas a los diferentes tratamientos de desinfección en estudio. Los explantes se mantuvieron a 18 °C, una humedad relativa del 40 % con un fotoperíodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad. Después se evaluó el porcentaje de contaminación, número de brotes viables y porcentaje de oxidación (Anexo 2).

- **Factores de estudio:**

### **Desinfección previa (2)**

**p1** = Con desinfección previa

**p2**= Sin desinfección previa

### **Alcohol (2)**

**a1** = Con alcohol 70% por 1 minuto

**a2** = Sin alcohol

### **Tiempo de exposición de hipoclorito de sodio al 2% (3)**

**e1** = Hipoclorito de sodio al 2% por 10 minutos

**e2** = Hipoclorito de sodio al 2% por 20 minutos

**e3** = Hipoclorito de sodio al 2% por 30 minutos

- **Variables:**

**Porcentaje de contaminación (%):**



El porcentaje de contaminación se evaluó a los 8 días mediante identificación visual.

**Porcentaje de oxidación (%):**

El porcentaje de oxidación se registró cada 10 días, esto se realizó mediante la identificación visual.

**Brotos viables (número de brotes viables):**

El número de brotes viables se los midió cada 30 días, esta evaluación se la realizó al observar el desarrollo del brote.

▪ **Unidad Experimental:**

La unidad experimental estuvo conformada por 1 brote por cada tubo de ensayo, con medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium).

▪ **Tratamientos:**

Tabla 3.

*Tratamientos para el establecimiento in vitro de brotes. INIAP. Cutuglagua, Pichincha 2017.*

Tratamiento	Código	Descripción
t1	p1a1e1	Con desinfección previa + alcohol 70% por 1 minuto + NaClO <sub>2</sub> 2% por 10 minutos
t2	p1a1e2	Con desinfección previa + alcohol 70% por 1 minuto + NaClO 2% por 20 minutos
t3	p1a1e3	Con desinfección previa + alcohol 70% por 1 minuto + NaClO <sub>2</sub> 2% por 30 minutos
t4	p1a2e1	Con desinfección previa sin alcohol + NaClO 2% por 10 minutos
t5	p1a2e2	Con desinfección previa sin alcohol + NaClO 2% por 20 minutos
t6	p1a2e3	Con desinfección previa sin alcohol + NaClO <sub>2</sub> 2% por 30 minutos
t7	p2a1e1	Sin desinfección previa + alcohol 70% por un minuto + NaClO 2% por 10 minutos
t8	p2a1e2	Sin desinfección previa + alcohol 70% por

		un minuto + NaClO 2% por 20 minutos
t9	p2a1e3	Sin desinfección previa + alcohol 70% por un minuto + NaClO 2% por 30 minutos
t10	p2a2e1	Sin desinfección previa sin alcohol + NaClO 2% por 10 minutos
t11	p2a2e2	Sin desinfección previa sin alcohol + NaClO 2% por 20 minutos
t12	p2a2e3	Sin desinfección previa sin alcohol + NaClO 2% por 30 minutos

**Nota:** Las letras que corresponden a los códigos, se colocaron de acuerdo a los factores de estudio.

- **Diseño Experimental y Análisis Funcional:**

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial 2x2x3 con 10 observaciones por cada tratamiento.

Además se utilizó la prueba LSD para analizar cuáles fueron las mejores interacciones que intervinieron para lograr una desinfección efectiva y se logre alto porcentaje de viabilidad en los brotes.

- **Esquema análisis de varianza:**

Tabla 4.

*ADEVA para el ensayo del establecimiento in vitro de brotes. INIAP. Cutuglagua, Pichincha 2017.*

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Grados de Libertad</b>
Total	119
Tratamientos	11
Desinfección previa (P)	1
Alcohol (A)	1
PxA	1
Tiempo de exposición de hipoclorito de	2

sodio (H)	
PxH	2
AxH	2
PxAxH	2
EE	108

### **Ensayo 3: Inducción de callos a partir de tejido foliar.**

Las hojas fueron llevadas al laboratorio para ser lavadas y desinfectadas. En cámara de flujo laminar se cortaron los bordes hasta dejar un cuadrado pequeño que se colocaron en cajas Petri que contuvieron los diferentes medios de cultivo con las hormonas en estudio. Después se evaluó la formación y tipo de callo. (Anexo 3)

- **Factores de estudio:**

#### **Medio de cultivo (2)**

**m1** = Medio Murashige y Skoog (M&S)

**m2** = Woody Plant Medium (WPM)

#### **Hormonas (3)**

**h1** = Thidiazuron(TDZ).

**h2** = N<sup>6</sup> isopentenil- adenine (2iP)

**h3** = Zeatina

#### **Dosis (2)**

**d1** = Alta (TDZ= 3ppm, 2iP= 6ppm, Zeatina= 6ppm)

**d2** = Baja (TDZ= 1,5ppm, 2iP= 4ppm, Zeatina= 4ppm)

- **Variables:**

#### **Formación de callo:**

Se determinó la formación de callos mediante observación cada 10 días del

desarrollo de la proliferación callosa en el tejido foliar.

**Tipo de callo:**

Se determinó el tipo de callo que se forme, al clasificar por su estructura morfogénica que se presente, como cualquiera de los siguientes: callo embriogénico, callo organogénico, callo mixto (embriogénico y organogénico), no morfogénicos o sin formación de callo.

▪ **Unidad Experimental:**

La unidad experimental estuvo conformada por una caja Petri con cinco explantes, en el medio de cultivo en estudio.

▪ **Tratamientos:**

Tabla 5.

*Tratamientos para la inducción de callos a partir de tejido foliar. INIAP. Cutuglagua, Pichincha 2017.*

Tratamiento	Código	Descripción
t1	m1h1d1	MS + TDZ + Dosis Alta (7,5ml/250ml)
t2	m1h2d1	MS + 2iP + Dosis Alta (15ml/250ml)
t3	m1h3d1	MS + Zeatina + Dosis Alta (15ml/250ml)
t4	m1h1d2	MS + TDZ + Dosis Baja (3,75ml/250ml)
t5	m1h2d2	MS + 2iP + Dosis Baja (7,5ml/250ml)
t6	m1h3d2	MS + Zeatina + Dosis Baja (10ml/250ml)
t7	m2h1d1	WPM + TDZ + Dosis Alta (7,5ml/250ml)
t8	m2h2d1	WPM + 2iP + Dosis Alta (15ml/250ml)
t9	m2h3d1	WPM + Zeatina + Dosis Alta (15ml/250ml)
t10	m2h1d2	WPM + TDZ + Dosis Baja (3,75ml/250ml)

t11	m2h2d2	WPM + 2iP + Dosis Baja (7,5ml/250ml)
t12	m2h3d2	WPM + Zeatina + Dosis Baja (10ml/250ml)

**Nota:** Las letras que corresponden a los códigos, se colocaron de acuerdo a los factores de estudio.

- **Diseño experimental y análisis funcional:**

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial 2x4x2 con 10 observaciones por cada tratamiento.

Además se utilizó la prueba LSD para analizar las diferencias significativas que existan en los medios de cultivo para la formación de callo.

- **Esquema análisis de varianza:**

Tabla 6.

*ADEVA para el ensayo de inducción de callos a partir de tejido foliar. INIAP. Cutuglagua, Pichincha 2017.*

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Grados de Libertad</b>
Total	159
Tratamientos	15
Medios de cultivo(M)	1
Hormonas (H)	3
MxH	3
Dosis (D)	1
MxD	1
HxD	3
MxHxD	3
EE	144

### **3.2. Características del sitio experimental**

#### **3.2.1. Ubicación**

El desarrollo de las tecnologías para realizar cultivos *in vitro* se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina, INIAP.

### 3.2.2. Características del lugar

Tabla 7.

*Características del lugar.*

<b>Provincia</b>	Pichincha
<b>Cantón</b>	Mejía
<b>Parroquia</b>	Cutuglagua
<b>Latitud</b>	00°22'00" S
<b>Longitud</b>	79° 32'00" W
<b>Altitud</b>	3058m
<b>Temperatura promedio Anual</b>	12.04°C
<b>Precipitación promedio Anual</b>	79%

Tomado de: Datos proporcionados por la Estación Meteorológica Izobamba, perteneciente al Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI), 2017.

### 3.2.3. Características del laboratorio

Tabla 8.

*Características del laboratorio.*

<b>Temperatura promedio</b>	27±2°C
<b>Fotoperíodo</b>	16/8 horas luz
<b>Intensidad de luz</b>	42-48 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
<b>Humedad relativa</b>	40%

Tomado de: INIAP, 2017.

### 3. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1. Ensayo 1: Establecimiento *in vitro* de semillas de mortiño.

Según el análisis del ADEVA, para el establecimiento *in vitro* de semillas de mortiño, tabla 9, muestran que los mejores tratamientos son T3 (MS + 24 horas luz + 18°C) y T7 (WPM + 24 horas luz + 18°C) con el 61% y 51% de germinación de semillas a los 80 días respectivamente por lo que para estos tratamientos se aplica la hipótesis alternativa. En tanto que, los tratamientos que se sometieron a menos horas luz y mayores temperaturas, no obtuvieron respuesta, y por ende se aplica la hipótesis nula para los tratamientos que no dieron resultado. El coeficiente de variación fue de 85.30%, las razones por las que se obtuvo este coeficiente alto se debe a que las semillas estaban bajo distintas condiciones diferentes, tales como luz, y temperatura, además solo 2 tratamientos respondieron con un porcentaje alto, dos medianamente bajos, y los demás no tuvieron respuesta, sin embargo a continuación se presentan las tablas del análisis estadístico correspondiente.

Tabla 9.

*Análisis de fuentes de variación de establecimiento de semillas in vitro de semillas de mortiño. INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.*

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Valor p
Total	39	28119,8			
Repeticiones	7	23139,38	3305,38	21,24	<0,0001
Medio de cultivo	1	105,63	105,63 ns	0,68	0,4161
Fotoperiodo	1	7155,63	7155,63*	45,98	<0,0001
Temperatura	2	8555,63	8555,63*	58,98	<0,0001
Medios de cultivo*Fotoperiodo	1	30,63	30,63*	0,20	0,6603
Medios de cultivo*Temperatura	2	105,63	105,63*	0,68	0,4161
Fotoperiodo*Temperatura	2	7155,63	7155,63*	45,98	<0,0001
Medios de cultivo*Fotoperiodo*Temperatura	2	30,63	30,63*	0,20	0,6603
Error	32	4980,00	155,63		
Coeficiente de variación	85.30				

Los resultados del análisis de las comparaciones entre factores para el establecimiento *in vitro* de semillas de mortiño se presentan a continuación:

Tabla 10.

*Prueba LSD Fisher para comparación entre factores para el establecimiento in vitro de semillas de mortiño INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.*

Medio de cultivo	Fotoperiodo	Temperatura	Medias	N	EE	Tratamiento	
1,00	2,00	1,00	61,00	5	5,58	A	t3
2,00	2,00	1,00	51,00	5	5,58	A	t7
1,00	1,00	1,00	4,00	5	5,58	B	t1
2,00	1,00	1,00	1,00	5	5,58	B	t5
2,00	2,00	2,00	0,00	5	5,58	B	t8
2,00	1,00	2,00	0,00	5	5,58	B	t6
1,00	2,00	2,00	0,00	5	5,58	B	t4
1,00	1,00	2,00	0,00	5	5,58	B	t2

Se realizaron los promedios de germinación de semillas a los 80 días, tabla 10, en la que se evidencia nuevamente los mejores resultados, al obtener los mejores tratamientos T3 (MS + 24 horas luz + 18°C) con 61% de germinación y T7 (WPM + 24 horas luz + 18°C) con el 51%, mientras que para los otros no se obtuvo respuesta.

Tabla 11.

*Promedios de germinación de semillas de mortiño a los 80 días.*

Medio de cultivo	Fotoperiodo	Temperatura	Medias	N	Tratamiento
1,00	2,00	1,00	61,00	5	t3
2,00	2,00	1,00	51,00	5	t7
1,00	1,00	1,00	4,00	5	t1
2,00	1,00	1,00	1,00	5	t5
2,00	2,00	2,00	0,00	5	t8
2,00	1,00	2,00	0,00	5	t6
1,00	2,00	2,00	0,00	5	t4
1,00	1,00	2,00	0,00	5	t2

Según los datos obtenidos se demuestra que los factores luz y temperatura son influyentes para estimular la germinación de semillas de mortiño, para lo cual Castro *et al*, en el 2012, mencionan que el factor luz es importante para la germinación en semillas debido a la presencia del fitocromo en el eje embrionario de la semilla, este pigmento se presenta de dos maneras en la



semilla, como Pr (P660) que es inactiva, y Prf (P730), que induce la germinación obteniendo resultados similares a *Vaccinium meridionale* que alcanzó 62% de germinación con un fotoperiodo de 24 horas luz, así mismo, en otros estudios, en especies como *V. myrtillus* y *V. vitis-idaea* se logró porcentajes de germinación que van del 62 a 100% en presencia de luz y a una temperatura de 10 a 20 °C (Baskin *et al.*, 2000). De igual manera se indica que la temperatura es el factor físico más importante debido al efecto sobre la capacidad de influir en la actividad de las enzimas que regulan la tasa de reacciones bioquímicas que se producen dentro de la semilla después de su rehidratación (Castro *et al.*, 2012).

Otro factor que influye es el uso de los medios de cultivo, para este ensayo se utilizaron MS y WPM, al encontrar el mejor porcentaje de germinación en el tratamiento T3 al lograr un 61% en el que se utilizó MS, sin embargo se evidenció que las plántulas que han germinado en este medio no eran vigorosas, se encuentran caídas en el medio, tienen un color opaco, y no presentan hojas, mientras que el tratamiento T7 que se utilizó WPM, a pesar que su porcentaje de germinación es del 51%, se observa a las plántulas vigorosas, con dos a tres pequeñas hojas, y color verde como se muestran en la imagen 1. Esto se debe a la composición del medio WPM, el cual es recomendado para las plantas leñosas ya que tiene una cantidad baja de sales, lo cual resulta beneficioso para la planta y reduce el porcentaje de oxidación (Torres *et al.*, 2010).

Las sales minerales cumplen una función importante dentro del crecimiento de las plantas, por ejemplo, así como lo menciona Molina, en el 2012, el nitrógeno es el que se encarga de la síntesis de tejidos, el fósforo es el constituyente principal de varias coenzimas, además ayuda en la biosíntesis de lípidos, en el proceso de fotosíntesis, y en la síntesis de clorofila, el potasio es el que aumenta la actividad fotosintética, además ayuda en la regulación de la presión osmótica de la célula, y disminuye la transpiración, el calcio es el que se encarga de mantener las células de la planta unidas, además de ayudar en el desarrollo de las raíces, el azufre contribuye con la regulación osmótica celular,

el hierro es requerido por las enzimas mitocondriales, el cobre es un elemento que la planta lo necesita en cantidades muy pequeñas entre 2 a 30ppm, la función del cobre está relacionado a la formación de un buen número de enzimas (Molina, 2012).

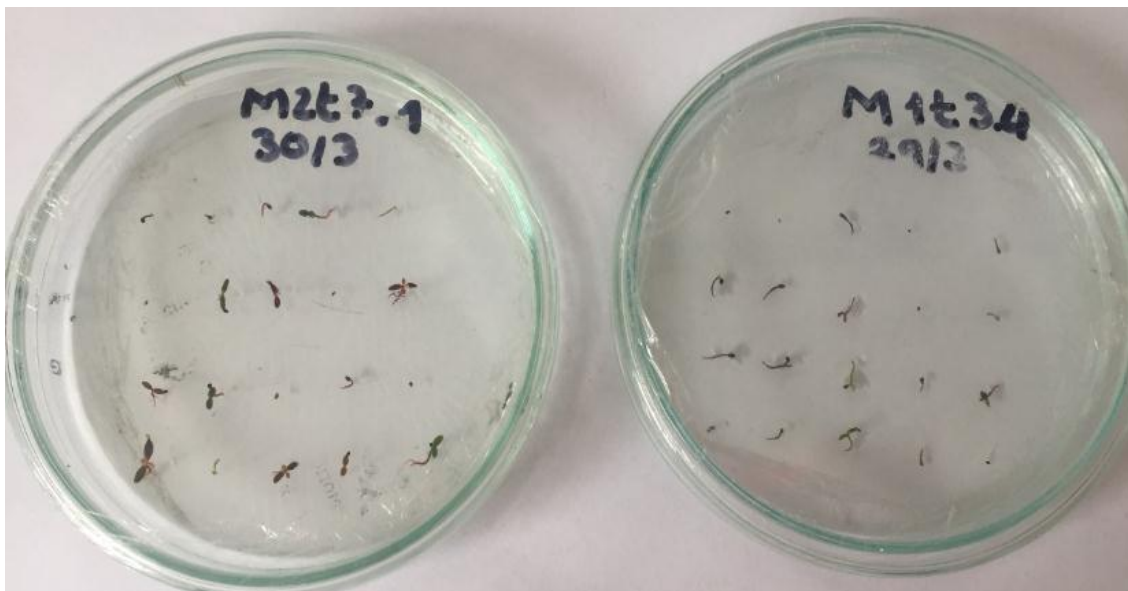


Figura 1. Comparación entre tratamientos T7 (izquierda) y T3 (derecha)

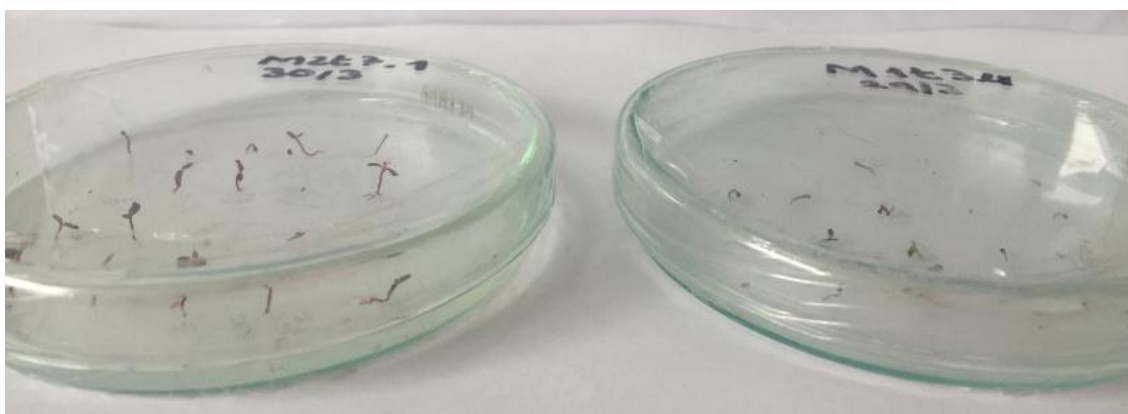


Figura 2. Comparación entre tratamientos T7 (izquierda) y T3 (derecha).

El inicio de la germinación se empezó a partir del día 10 al día 20 en los tratamientos T3 (MS + 24 horas luz + 18°C) T5 (WPM + 16 horas luz + 18°C) y T7 (WPM + 24 horas luz + 18°C) con un promedio de germinación de 5, 1 y 7% respectivamente. A si mismo, se observa que desde el día 20 hasta el día 70 existe un importante incremento en el porcentaje de germinación, estabilizándose hasta el día 80, al mostrar los tratamientos T1 (MS + 16 horas

luz + 18°C) T3 (MS + 24 horas luz + 18°C) T5 (WPM + 16 horas luz + 18°C) y T7 (WPM + 24 horas luz + 18°C) con un promedio de germinación de 4, 61, 1 y 51% siendo el final de la germinación como se observa en el gráfico 1.

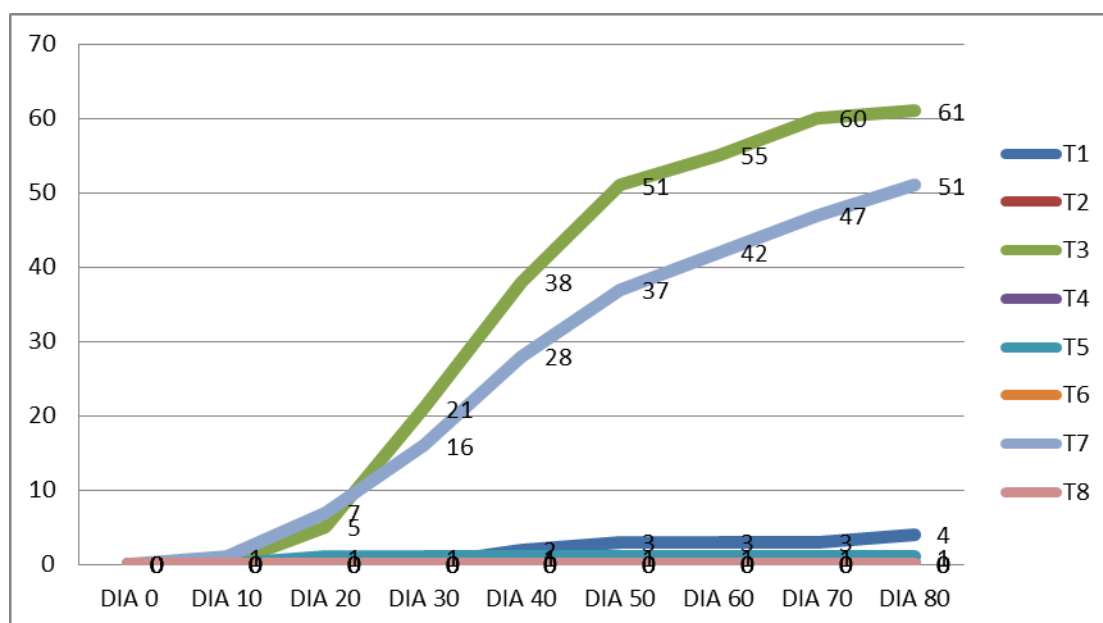


Figura 3. Inicio y fin de germinación de semillas in vitro de mortiño.

## 4.2. Ensayo 2: Establecimiento *in vitro* de brotes.

### 4.2.1 Análisis de fuentes de variación (contaminación)

Según el análisis del ADEVA, para la variable contaminación a los 8 días, tabla 10, muestran para desinfección previa, y tiempo NaOCl 2%, significación estadística mientras que para Alcohol 70% no existe diferencia estadística. El coeficiente de variación fue de 56.18%.

Tabla 12.

*Análisis de fuentes de variación de contaminación. INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.*

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Valor p
Total	119	24,79			
Repeticiones	11	2,41	0,70	4,42	<0,0001

Desinfección previa	1	2,41	2,41*	15,21	0,0002
Alcohol 70%	1	0,41	0,41ns	2,58	0,1112
Tiempo NaOCl 2%	2	2,92	1,46*	9,21	0,0002
Desinfección previa x alcohol 70%	1	0,67	0,67*	4,26	0,0413
Desinfección previa x tiempo NaOCl 2%	2	0,72	0,36*	2,26	0,1089
Alcohol 70% x tiempo NaOCl 2%	2	0,22	0,11*	0,68	0,5067
Desinfección previa x alcohol 70% x tiempo NaOCl 2%	2	0,35	0,17*	1,11	0,3348
Error	108	17,10	0,16		
Coficiente de variación	56,18				

Los resultados del análisis de las comparaciones entre factores para contaminación de brotes se presentan a continuación:

Tabla 13.

*Prueba LSD Fisher para comparación entre factores (contaminación). INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.*

Desinfección previa	Alcohol 70%	Tiempo NaOCl 2%	Medias	N	E.E				Tratamientos	
1,00	1,00	2,00	0,30	10	0,13	A			t2	
1,00	2,00	3,00	0,40	10	0,13	A	B		t6	
1,00	1,00	3,00	0,40	10	0,13	A	B		t3	
2,00	1,00	3,00	0,60	10	0,13	A	B	C	t9	
2,00	2,00	3,00	0,60	10	0,13	A	B	C	t12	
1,00	1,00	1,00	0,60	10	0,13	A	B	C	t1	
1,00	2,00	2,00	0,70	10	0,13		B	C	D	t5
2,00	2,00	1,00	0,90	10	0,13			C	D	t10
1,00	2,00	1,00	1,00	10	0,13				D	t4
2,00	2,00	2,00	1,00	10	0,13				D	T11
2,00	1,00	2,00	1,00	10	0,13				D	T8
2,00	1,00	1,00	1,00	10	0,13				D	T7

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

Para realizar el análisis estadístico de la variable correspondiente a contaminación, se lo evaluó a los 8 días después de que se introdujera el ensayo, así como lo muestra la tabla 11, donde existen diferencias significativas en los tratamientos utilizados para disminuir el porcentaje de contaminación, siendo el mejor tratamiento T2 (desinfección previa, alcohol al 70% por un minuto, e hipoclorito de sodio con concentración al 2% durante 20 minutos), el cual obtiene una contaminación del 30%, por lo tanto se aplica la hipótesis alternativa. La contaminación evidenciada fue causada principalmente por hongos que probablemente resistieron al tratamiento de desinfección de los

explantes, los cuales provenían de plantas establecidas en campo abierto pero con controles fitosanitarios frecuentes, así mismo, la desinfección previa es influyente en la reducción de los microorganismos al mejorar los resultados obtenidos por Torres *et al*, en el 2010, que obtuvo un porcentaje de contaminación del 40%. Hine *et al*, en el 2013, menciona que la contaminación por hongos es muy común cuando se realizan ensayos en tejidos, principalmente cuando éstos son extraídos de plantas adultas, y esto se evidencia ya que para esta investigación se utilizaron explantes de plantas adultas, las cuales habían crecido en el campo durante periodos largos, mientras que si se utilizan tejidos jóvenes, o a su vez material que ha estado en invernadero bajo condiciones controladas, la contaminación será mínima. Por lo tanto en tejidos adultos, se necesita una desinfección más fuerte, para ello se hace uso del hipoclorito de sodio, y etanol de 70°, mientras que en tejidos jóvenes, la desinfección es menos drástica ya que se la puede realizar con facilidad al eliminar de forma más rápida la contaminación.

Además, los tiempos de exposición de hipoclorito son importantes dado que a menores tiempos disminuye su efecto antimicrobiano para lo cual, Perla en el 2007, afirma que a mayor tiempo de exposición, la contaminación será erradicada pero se debe controlar la oxidación ya que si no se controla los explantes comenzarán a presentar necrosis.

#### **4.2.2 Análisis de fuentes de variación (oxidación)**

Según el análisis del ADEVA, para la variable de oxidación a los 20 días, tabla 12, muestran para desinfección previa, y tiempo NaOCl 2%, significación estadística mientras que para Alcohol 70% no existe diferencia estadística. El coeficiente de variación fue de 47,85%.

Tabla 14.

*Análisis de fuentes de variación de oxidación. INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.*

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Valor p
Total	119	19,79			
Repeticiones	11	4,29	0,39	2,72	0,0039
Desinfección previa	1	1,41	1,41*	9,81	0,0022
Alcohol 70%	1	0,41	0,41ns	2,85	0,0945
Tiempo NaOCl 2%	2	1,62	0,81*	5,63	0,0047
Desinfección previa x alcohol 70%	1	0,07	0,07*	0,52	0,4713
Desinfección previa x tiempo NaOCl 2%	2	0,52	0,26*	1,80	0,1702
Alcohol 70% x tiempo NaOCl 2%	2	0,12	0,06*	0,41	0,6670
Desinfección previa x alcohol 70% x tiempo NaOCl 2%	2	0,15	0,08*	0,52	0,5945
Error	108	15,50	0,14		
Coeficiente de variación	47,85				

Los resultados del análisis de las comparaciones de factores de brotes oxidados se presentan a continuación:

Tabla 15.

*Prueba LSD Fisher para comparación entre factores (oxidación). INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.*

Desinfección previa	Alcohol 70%	Tiempo NaOCl 2%	Medias	N	E.E	Tratamientos		
1,00	1,00	2,00	0,40	10	0,12	A		t2
1,00	2,00	3,00	0,60	10	0,12	A	B	t6
1,00	1,00	3,00	0,60	10	0,12	A	B	t3
1,00	2,00	2,00	0,70	10	0,12	A	B	C
2,00	1,00	3,00	0,70	10	0,12	A	B	C
1,00	1,00	1,00	0,80	10	0,12		B	C
2,00	2,00	3,00	0,80	10	0,12		B	C
2,00	1,00	2,00	0,90	10	0,12		B	C
1,00	2,00	1,00	1,00	10	0,12			C
2,00	2,00	1,00	1,00	10	0,12			C
2,00	1,00	1,00	1,00	10	0,12			C
2,00	2,00	2,00	1,00	10	0,12			C

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

Para realizar el análisis estadístico de la variable oxidación, se lo realizó a los 20 días después de que se introdujo el ensayo, descartado los brotes contaminados, según la tabla 13, el mejor tratamiento para variable el

porcentaje de oxidación fue T2 (desinfección previa, alcohol al 70% por un minuto, e hipoclorito de sodio con concentración al 2% durante 20 minutos.) Al alcanzar un 40% de oxidación, por lo cual se aplica la hipótesis alternativa. Este resultado pudo deberse a diversos factores siendo uno de los más importantes el problema que tienen las especies leñosas al estrés oxidativo dado son más propensas al estrés oxidativo y nitrosativo que sufren las células del explante cultivado. Este fenómeno se produce por el desbalance entre las reacciones pro-oxidación (excesiva formación de ROS y, o RNS o de naturaleza enzimática) y los mecanismos antioxidantes para detoxificar (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos), generalmente causado por una generación incrementada de radicales libres (Azofeifa, 2009).

Para reducir este porcentaje de oxidación que se presentan en los tallos, se puede hacer uso de antioxidantes los más comunes y utilizados son el ácido cítrico y ácido ascórbico, éstos se los puede agregar de diferentes formas, Torres *et al*, hizo un pretratamiento a los explantes, es decir realizó el corte de los tallos en una solución estéril de ácido cítrico, antes de colocarlos en el medio de cultivo. Además Azofeifa, en el 2009, también recomienda el uso de carbón activado, este se lo puede agregar directamente al medio de cultivo, así ayuda a remover los compuestos fenólicos, y de esta manera se evita o se disminuye el deterioro del explante.

#### 4.2.3 Análisis de fuentes de variación (brotes viables)

Según el análisis del ADEVA, para la variable de brotes viables a los 30 días, tabla 14, muestran para desinfección previa no existe significancia, mientras que para alcohol al 70% y tiempo NaOCl 2% si existe una diferencia significativa. El coeficiente de variación fue de 25,25%.

Tabla 16.

*Análisis de fuentes de variación de brotes viables. INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.*

Fuentes de variación de	Grados de	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Valor p
-------------------------	-----------	-------------------	----------------	---	---------

libertad					
Total	119	7,47			
Repeticiones	11	1,47	0,13	2,40	0,0105
Desinfección previa	1	0,00	0,00ns	0,00	>0,9999
Alcohol 70%	1	0,30	0,30*	5,40	0,0220
Tiempo NaOCl 2%	2	0,72	0,36*	6,45	0,0023
Desinfección previa x alcohol 70%	1	0,03	0,03*	0,60	0,4403
Desinfección previa x tiempo NaOCl 2%	2	0,05	0,02*	0,45	0,6388
Alcohol 70% x tiempo NaOCl 2%	2	0,35	0,18*	3,15	0,0468
Desinfección previa x alcohol 70% x tiempo NaOCl 2%	2	0,02	0,01*	0,15	0,8609
Error	108	6,00	0,06		
Coeficiente de variación	25,25				

Los resultados del análisis de las comparaciones entre factores de brotes viables se presentan a continuación:

Tabla 17.

*Prueba LSD Fisher para comparación entre factores (brotes viables). INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.*

Desinfección previa	Alcohol 70%	Tiempo NaOCl 2%	Medias	N	E.E	Tratamientos		
2,00	1,00	3,00	0,70	10	0,07	A	t9	
1,00	1,00	3,00	0,70	10	0,07	A	t3	
2,00	2,00	3,00	0,90	10	0,07	A	B	t12
1,00	1,00	2,00	0,90	10	0,07	A	B	t2
2,00	1,00	1,00	1,00	10	0,07		B	t7
1,00	2,00	3,00	1,00	10	0,07		B	t6
1,00	2,00	1,00	1,00	10	0,07		B	t4
1,00	2,00	2,00	1,00	10	0,07		B	t5
2,00	2,00	2,00	1,00	10	0,07		B	t11
2,00	2,00	1,00	1,00	10	0,07		B	t10
2,00	1,00	2,00	1,00	10	0,07		B	t8
1,00	1,00	1,00	1,00	10	0,07		B	t1

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

Para realizar el análisis estadístico de la variable brotes viable a los 30 días después de que se introdujera el ensayo, tabla 15, existe una diferencia significativa entre los tratamientos, al mostrar los mejores resultados los tratamientos T9 (Sin desinfección previa + alcohol 70% por un minuto + NaClO 2% por 30 minutos), y T3 (Con desinfección previa + alcohol 70% por 1 minuto + NaClO2% por 30 minutos) al alcanzar un 30 % de brotes viables, por lo tanto



que se aplica la hipótesis alternativa. Estos resultados se deben a diversos factores, tales como la edad del explante, lo que quiere decir es que si se utilizan explantes jóvenes se va a tener una mayor viabilidad, mientras que si se hace uso de explantes maduros la viabilidad de los mismos será mínima (Gutiérrez, 2011).

Además hay que tomar en cuenta diversos factores que garanticen la viabilidad de los brotes ya desinfectados, así como menciona Azofeifa en el 2009, recomienda el uso de antioxidantes como un pretratamiento antes de que los brotes sean sembrados en los medios de cultivo, o a su vez aplicar antioxidantes en el medio y refrescar los medios y se deben realizar subcultivos para que la viabilidad del explante se prolongue.

#### **4.3 Ensayo 3: Inducción de callos a partir de tejido foliar.**

Para este ensayo no se obtuvieron resultados satisfactorios, por lo tanto se aplica la hipótesis nula, esto fue porque todos los explantes se oxidaron a pesar de que en los medios de cultivo se utilizaron hormonas para estimular la generación de callos, no hubo presencia de los mismos, la explicación técnica para esto, es la edad del explante, así como menciona Rache *et al*, en el 2010, si se utilizan explantes de plantas adultas, éstos van a sufrir pardeamiento y morirán, esto se debe a los distintos desinfectantes que se utilizan para evitar la contaminación. Sin embargo, en un ensayo paralelo que se realizó independiente de esta investigación en el laboratorio, se utilizaron hojas de plántulas *in vitro*, y a partir de los 30 días se observó formación de callos, por lo cual se afirma que para este tipo de ensayos es mejor utilizar hojas de plantas *in vitro*. En un estudio realizado en el 2014, por Brenes *et al*, asevera que en las plantas de género *Vaccinium* el establecimiento y crecimiento *in vitro* de explantes tomados de plantas adultas provenientes de campo son limitados, esto se debe a la alta contaminación y oxidación, además de la baja respuesta al establecimiento, para dicha investigación se tomaron hojas maduras, sin obtener resultados satisfactorios, ya que la misma no presentó ninguna respuesta, por ello Brenes *et al*, recomienda el uso de hojas provenientes de

plantas o brotes ya establecidos *in vitro* previamente. En la figura 4 se observa de mejor manera la comparación entre el tratamiento con hojas de plantas adultas y el tratamiento con hojas de plantas *in vitro*.

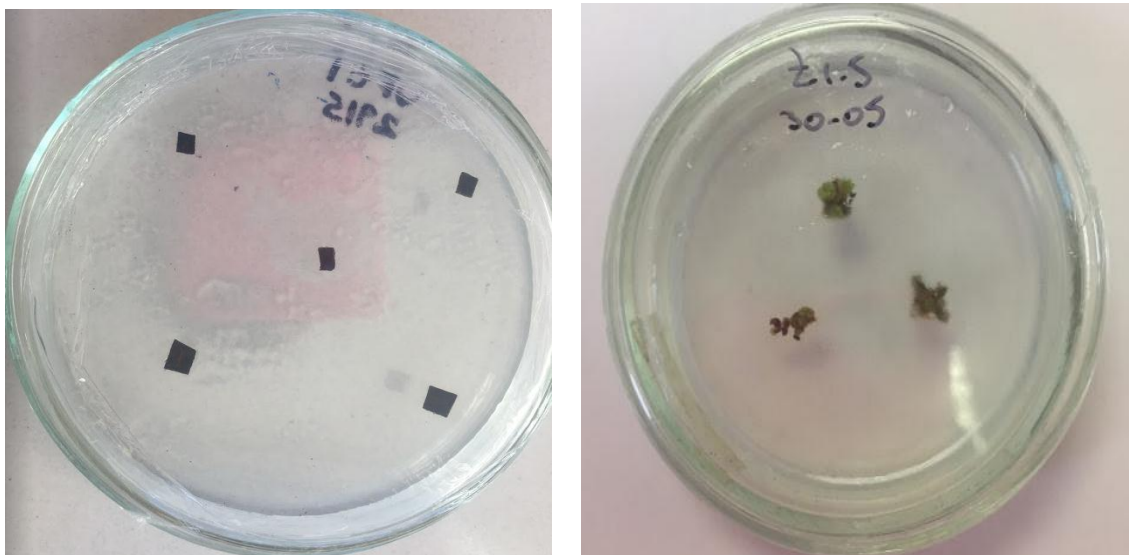


Figura 4. Hoja oxidada y sin formación de callos (izq) hoja con formación de callos (der)

## 5.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

Para los explantes de semillas si se logró establecer el material vegetal *in vitro*, por lo tanto la metodología propuesta funcionó obteniendo buenos resultados.

El factor luz es importante para acelerar la germinación, a mayor horas luz, mayor porcentaje de germinación, por lo cual se observó que las semillas expuestas a 24 horas luz tuvieron un alto porcentaje de germinación.

El mejor medio de cultivo para las plantas leñosas es el WPM, con este medio se garantiza que las plántulas que se generaron por la germinación de las semillas sean vigorosas, presenten color verde, y tengan cada una de ellas entre dos a cuatro pequeñas hojas.

La temperatura más adecuada para la germinación de semillas de mortiño es de 18°C, esto se debe a que las plantas de mortiño crecen en el páramo, por lo que necesitan de este tipo de temperaturas, y para esta investigación se buscó colocar las condiciones climáticas más parecidas a las que esta planta necesita para crecer.

Los resultados obtenidos a partir de la experimentación de los tres tipos de explantes dan a conocer que si se optimizó el protocolo de desinfección para brotes.

Para brotes se logró dejar material vegetal introducido, pero debido a la procedencia de las plantas (es decir plantas adultas), no se observa una regeneración.

Según el análisis estadístico realizado, se evidenció que el mejor tratamiento para desinfección de brotes, es T2 en el que se aplica una desinfección previa, más alcohol al 70% por 1 minuto, más NaOCl al 2% por 20 minutos, con dicho tratamiento se obtienen los brotes sin contaminación.

No se obtuvo respuesta favorable ante la inducción de formación de callos en hojas, debido a la edad del explante y por ello todas las hojas terminaron oxidadas y por último murieron.

## **5.2. Recomendaciones**

Probar temperaturas menores a 18°C, para analizar si existe alguna temperatura que mejore los resultados y dé mayor porcentaje de germinación.

Obtenidas las plántulas de las semillas se recomienda que se las debe pasar a tubos de ensayo individuales con medio de cultivo WPM, para garantizar la supervivencia de las mismas, y así mismo probar ya con hormonas para

promover su crecimiento.

Realizar una prueba de tetrazolium para asegurar la viabilidad de las semillas escogidas para el ensayo.

Para disminuir el porcentaje de contaminación, se recomienda utilizar brotes inmaduros o jóvenes, o en su defecto usar plantas de invernadero ya que éstas tienen las condiciones controladas, y de esta manera se garantiza que el proceso de desinfección sea más rápido y no sea tan drástico.

Para una futura investigación se recomienda realizar un estudio para probar la efectividad del uso de antioxidantes aparte de ácido cítrico y ácido ascórbico, para los brotes antes de que sean sembrados en su medio de cultivo, estos antioxidantes pueden ser añadidos en el medio de cultivo o pueden ser aplicados en el proceso de desinfección.

Realizar un subcultivo de brotes a los 20 días para refrescar el medio, y así garantizar un número mayor de brotes viables, este medio de cultivo en el cual se van a trasplantar los brotes debe ser WPM, ya con hormonas para estimular el crecimiento de la planta.

Para estimular la formación de callos se recomienda utilizar explantes de plantas *in vitro*, de esta manera se garantiza que la hoja esté libre de patógenos.

## REFERENCIAS

- Arteaga, M. (2014). *Relación del desarrollo del color con el contenido de antocianinas y clorofila en diferentes grados de madurez de mortiño (Vaccinium floribundum)*. Enfoque UTE 5(2)
- Azofeifa, A. (2009). *Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados In Vitro*. Agronomía Mesoamericana.
- Brenes, A; Castillo, R; Gómez, L. (2014). *Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (Vaccinium spp.) a partir de segmentos foliares de dos procedencias*. Agronomía Costarricense.
- Cárdenas, A y Espinoza, R. (2014). *Guía práctica de cultivos in vitro de especies vegetales*. Universidad Politécnica Salesiana de Quito.
- Castro, C; Olarte, Y; Rache, L, y Pacheco J. (2012). *Establecimiento de un protocolo para germinación de agraz (Vaccinium meridionale Swartz)*. Agronomía Colombiana.
- Coba, P; Coronel, D; Verdugo, K; Paredes, F; Yugsi, E y Huachi, L. (2012). *Estudio Etnobotánico del Mortiño (Vaccinium floribundum) como alimento ancestral y potencial alimento funcional*. La Granja, 16(2)
- Cobo, M. (2014). *Estudio de diversidad genética de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) en tres Provincias de la Sierra ecuatoriana: Imbabura, Pichincha y Cotopaxi*. Universidad San Francisco de Quito.
- Duque, J (2010). *Bioteología panorámica de un sector*. España.
- EcuRed. Medios de cultivo para la propagación *in vitro*. Recuperado el 11 de julio de 2017 de [https://www.ecured.cu/Medios\\_de\\_cultivo\\_para\\_la\\_propagaci%C3%B3n\\_in\\_vitro](https://www.ecured.cu/Medios_de_cultivo_para_la_propagaci%C3%B3n_in_vitro)
- GAD Gobierno Autónomo Descentralizado SIGCHOS. *Vino de mortiño de Quinticusig de Sigchos para el Mundo (en línea)*. Recuperado el 18 de diciembre. 2016 de <http://gadmigchos.gob.ec/pag2015/index.php/noticias/el-vino-de-mortino-de-quinticusig>.

- García, OD. (2007). *Programa Conocimiento y Mejoramiento de los Recursos Naturales: Macro y Micro-Propagación de especies del bosque altoandino*. Medellín, Colombia. Informe Final de Actividades. CORANTIOQUIA.
- Gutiérrez, C. (2011). *Evaluación de las estrategias de la especie Vaccinium floribundum propagación in vitro (Familia Ericaceae) presente en el páramo Cruz Verde*. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales.
- Medina, C; Lobo, M; Castaño, Á y Cardona, L. (2015). *Análisis del desarrollo de plantas de mortiño (Vaccinium meridionale Swart.) bajo dos sistemas de propagación: clonal y sexual*. Antioquia: Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 16(1)
- Ministerio de Agricultura, G. A. (s.f.). Sigchos produce y comercializa vino de mortiño. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <http://www.agricultura.gob.ec/sigchos-produce-y-comercializa-vino-de-mortino/>
- Molina, C. (2012). *Evaluación de cinco medios de cultivo (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) y tres dosis de auxina y citoquinina para la germinación de semilla en Compartmentia speciosa*. Universidad de Cuenca.
- Moreta, M. (2016). En Sigchos se elabora vino de mortiño. Revista Líderes, Quito, Ecuador; 7 Nov.
- Noboa, V. (2011). *Efecto de seis tipos de sustratos y tres dosis de ácido Naftalenacético en la propagación vegetativa de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Pérez, S; Valdivieso, C, (2007). *Colección y caracterización morfológica In situ del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) en la Sierra norte del Ecuador*. Escuela Politécnica del Ejército.
- Perla, H, (2007). *Evaluación de métodos de desinfección y tipos de explante de la especie vegetal Piperoradendron Trel. & Standl., para el establecimiento In Vitro*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Rache, L; Pacheco, J, (2010). *Propagación in vitro de plantas adultas Vaccinium meridionale (Ericaceae)*. Laboratorio BIOPLASMA.

- Ramos, J, (2012). *Avances de la micropropagación in vitro de las plantas leñosas*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).
- Restrepo, DC. (2013). *Micropropagación clonal de tres genotipos mortiño, Vaccinium meridionale SW, por proliferación de yemas axilares*. Actual Biol 35(99): p. 135-144
- Torres, M; Trujillo, Diana y Arahana, Venancio, 2010. *Cultivo In Vitro de Mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)*. Avances 2.

## **ANEXOS**



**Anexo 1. Desinfección de semillas (Torres *et al.*, 2010).**

- Desinfección con alcohol al 70 % por tres minutos
- Enjuague con agua destilada estéril por una ocasión.
- Desinfección con hipoclorito de sodio al 2.5% mas 4 gotas Tween 20 por 10 minutos.
- Enjuague con agua destilada estéril por cinco ocasiones.

**Anexo 2. Desinfección previa de brotes de mortiño**

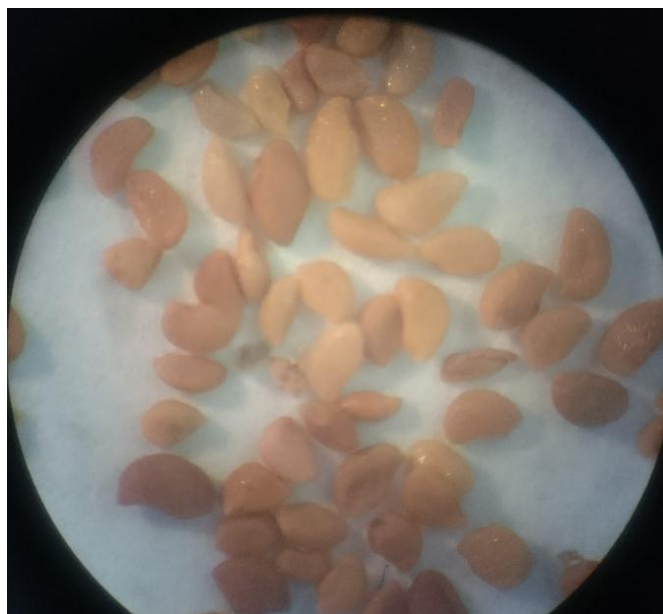
- Desinfección previa con aplicación de fungicidas carbendazim (2ml), sulfato de cobre pentahidratado (2ml), y antioxidantes ácido cítrico (200mg) y ácido ascórbico (200mg) por 60 minutos.
- Enjuague con agua destilada estéril por una ocasión.
- Desinfección con alcohol al 70% por un minuto
- Desinfección con hipoclorito de sodio al 2% mas 5 gotas Tween 20 por 10 minutos.
- Enjuague con agua destilada estéril por cinco ocasiones.

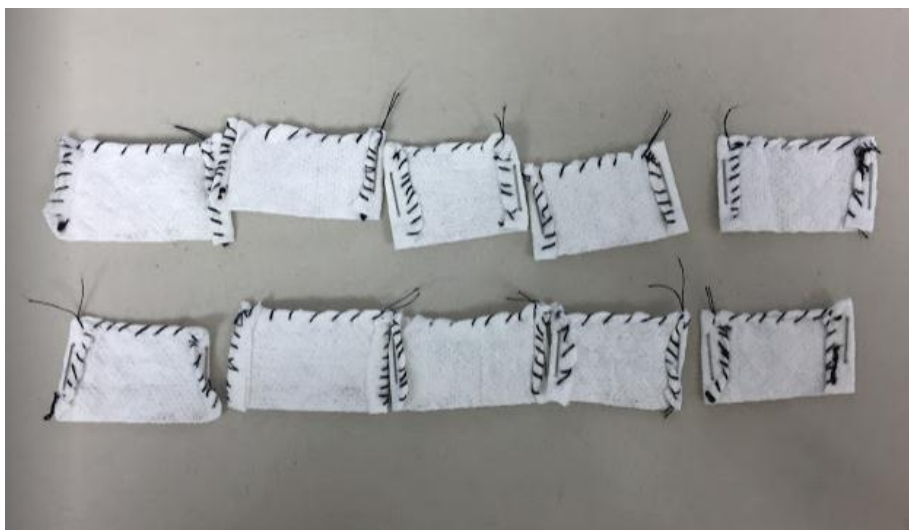
**Anexo 3. Desinfección de hojas**

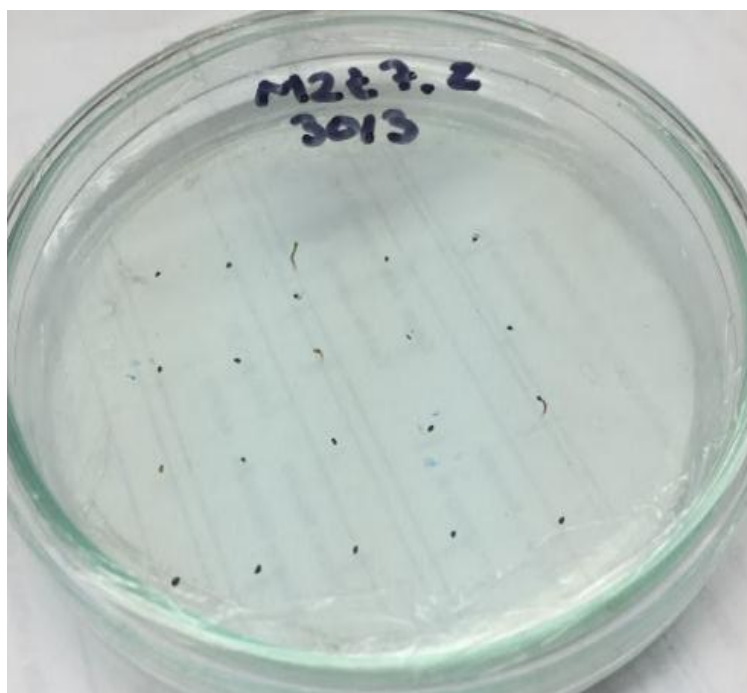
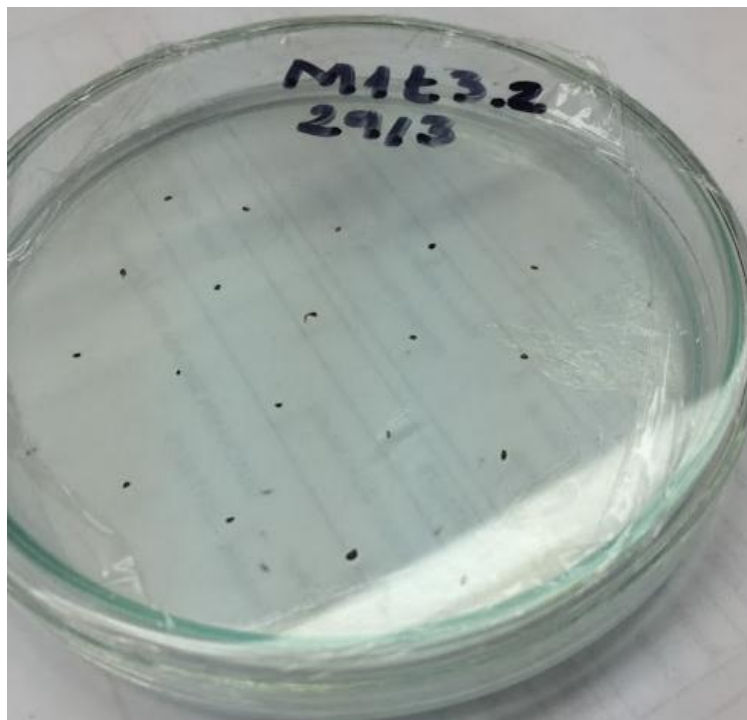
- Lavado con agua más jabón.
- Povidin 1 ml por 30 minutos.
- Carbendazim más sulfato de cobre pentahidratado (1ml por cada 100ml de agua destilada estéril) por 60 minutos.
- Enjuague con agua destilada estéril por una ocasión.
- Hipoclorito de sodio al 0,1% por 60 minutos.
- Alcohol al 70% por 1 minuto.
- Enjuague con agua destilada estéril por una ocasión.
- Hipoclorito de sodio al 10% más 4 gotas de Tween por 10 minutos.
- Enjuague con agua destilada estéril por cinco ocasiones

**Anexo 4. Colecta de material vegetal (Mortino *Vaccinium floribundum*)**

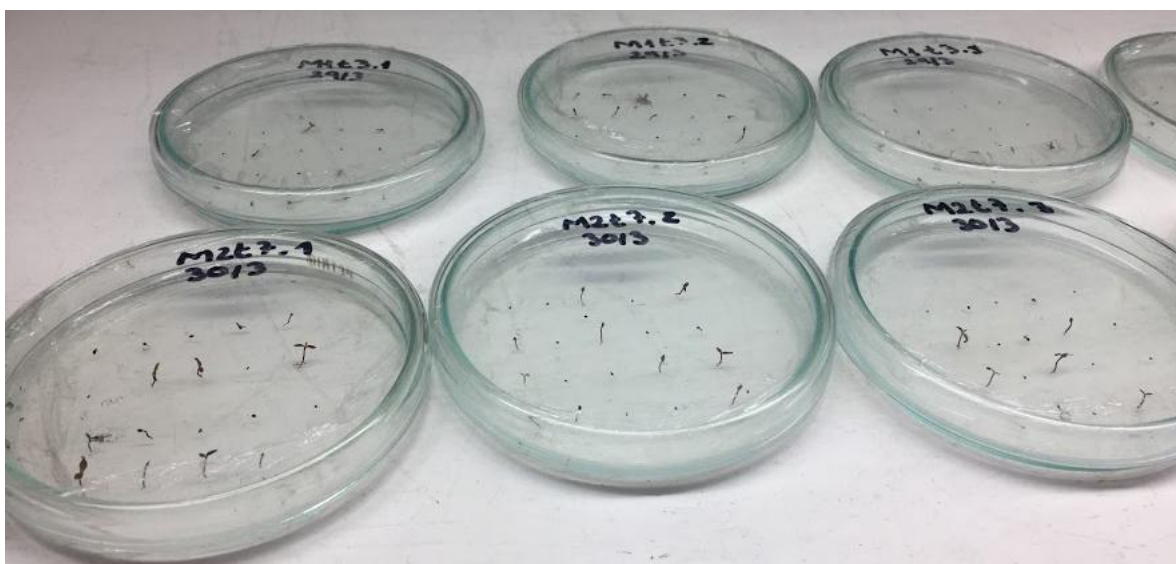
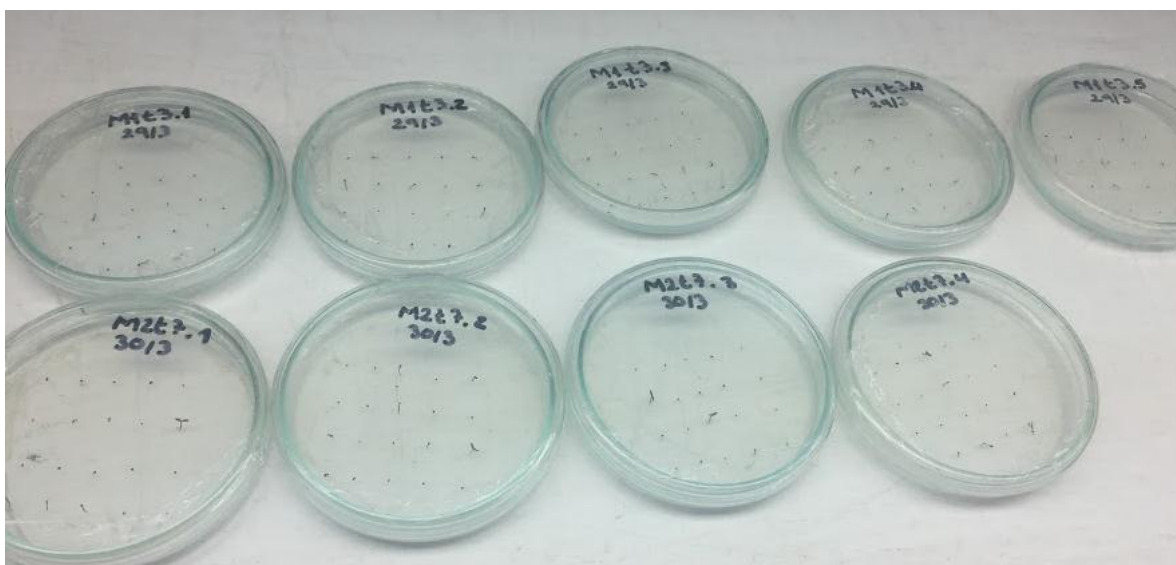


**Anexo 5. Semillas de mortiño bajo vista de estereomicroscopio**

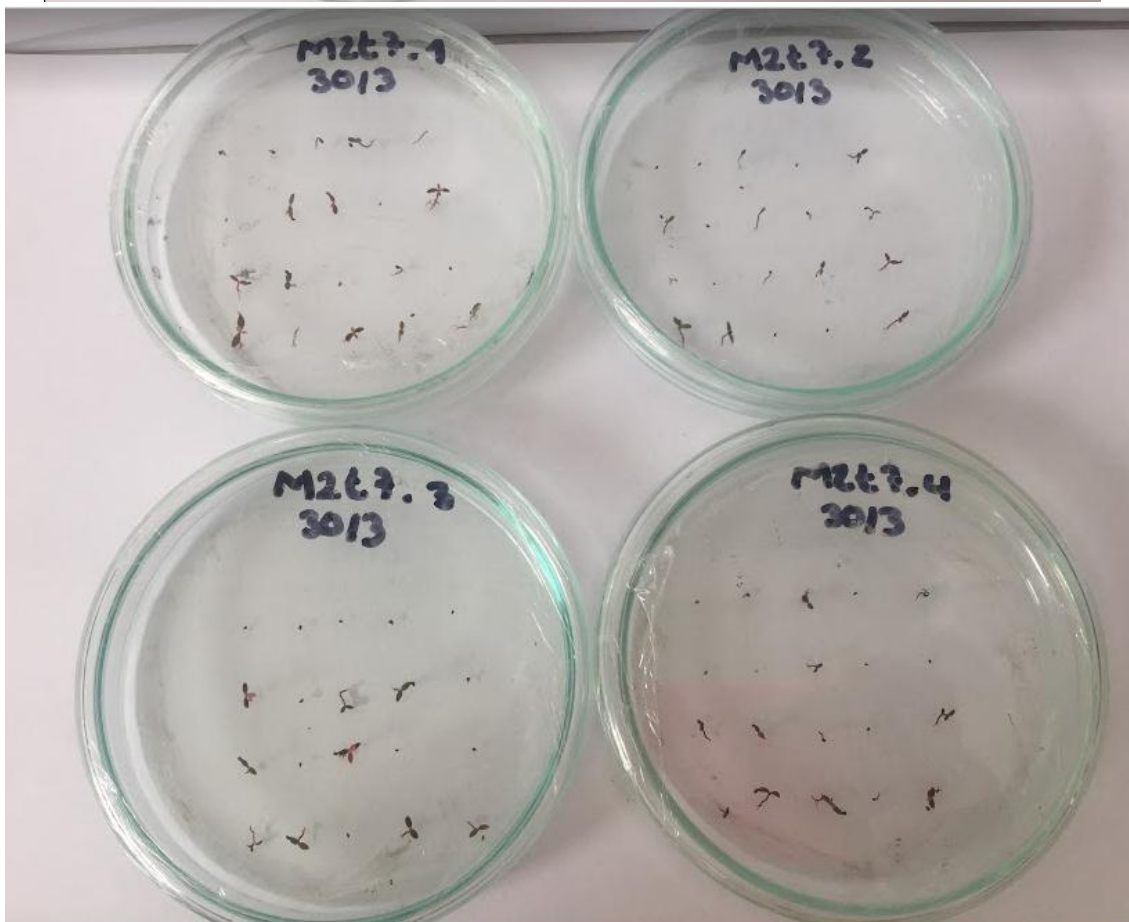
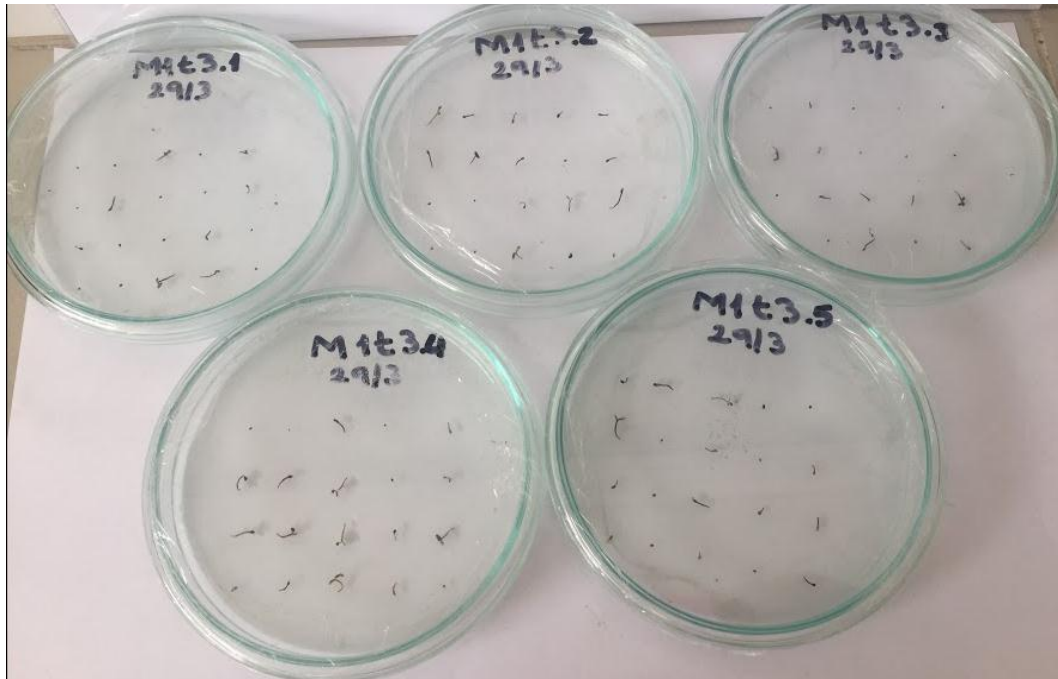
**Anexo 6. Funditas de papel para colocar las semillas para la desinfección**

**Anexo 7. Inicio de germinación**

## Anexo 8. Germinación de semillas



Anexo 9. Fin de germinación de semillas



### Anexo 10. Desinfección de brotes

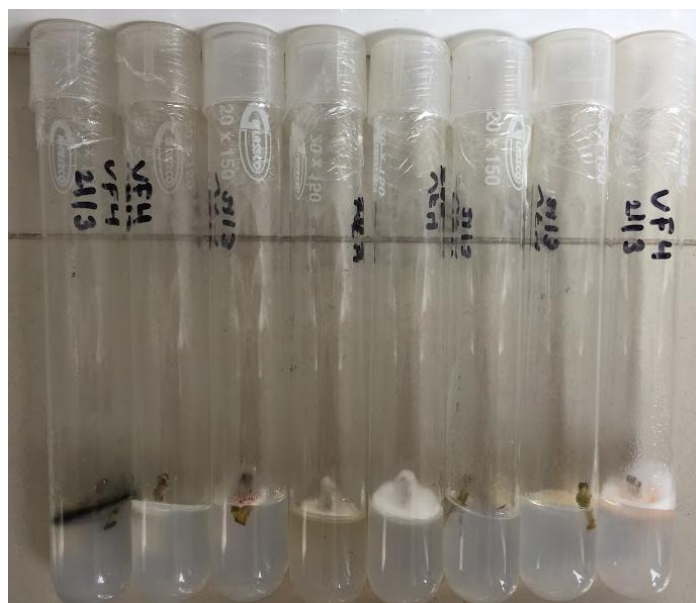




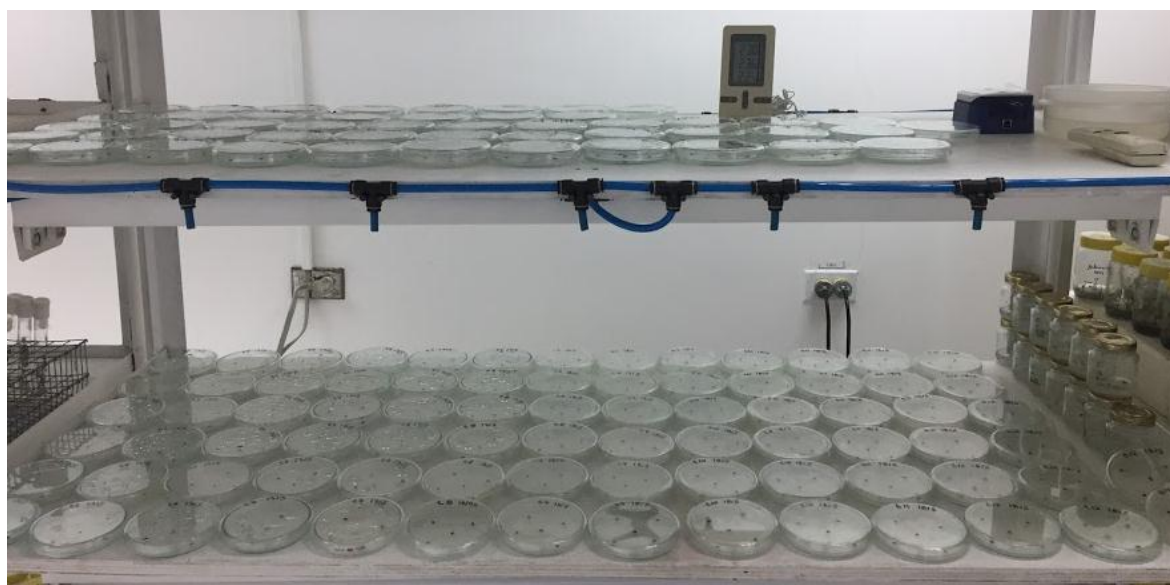
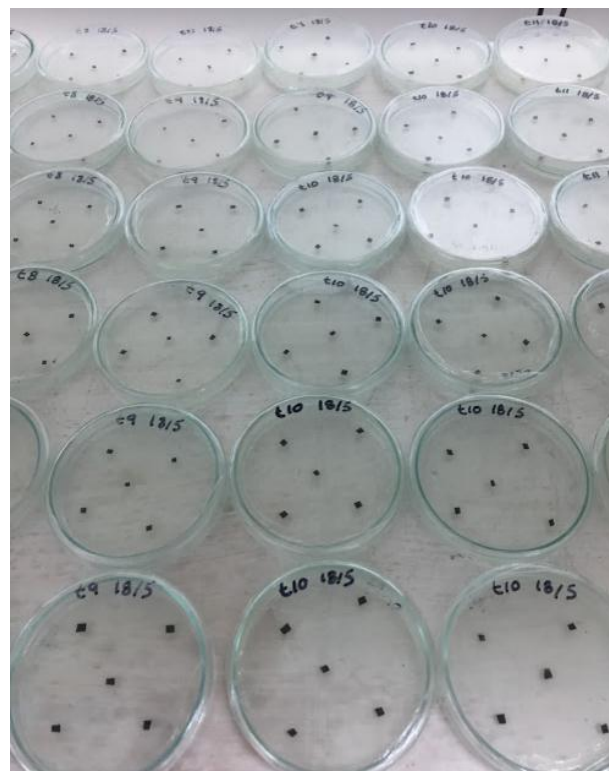
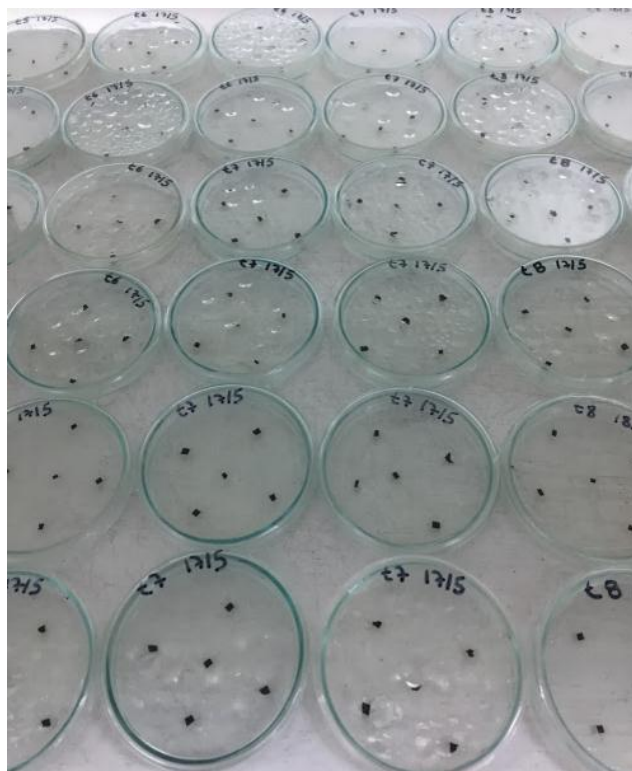
### Anexo 11. Introducción de brotes



### Anexo 12. Brotes contaminados



### Anexo 13. Introducción de hojas



**Anexo 14. Hoja oxidada y sin formación de callo**