



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Efecto de dos dosis de micorrizas y dos tipos de sustratos en la aclimatación de plántulas in vitro de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

Moposita Lasso, Evelyn Viviana

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria








PhD. Pérez Guerrero, Patricio Alejandro

07 de octubre del 2020

Document Information

Analyzed document	Tesis Viviana Moposita.docx (D80952644)
Submitted	10/7/2020 4:50:00 PM
Submitted by	Perez Guerrero Patricio Alejandro
Submitter email	paperez11@espe.edu.ec
Similarity	8%
Analysis address	paperez11.espe@analysis.orkund.com

Sources included in the report

W	URL: https://dspace.pucesi.edu.ec/bitstream/11010/423/1/1.%20TESIS%20%28GRACE%20CAROLIN... ... Fetched: 12/5/2019 11:55:32 PM		1
SA	GRACE CHAMORRO TESIS.pdf Document GRACE CHAMORRO TESIS.pdf (D51861841)		13
W	URL: https://www.researchgate.net/publication/228792577_Cultivo_in_vitro_del_mortino_Va... Fetched: 11/1/2019 5:58:37 AM		2
SA	TESIS final MOYA LILIANA.docx Document TESIS final MOYA LILIANA.docx (D62707337)		10
W	URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342015000300007... Fetched: 10/7/2020 4:53:00 PM		1
SA	PROYECTO BIOTECNOLOGIA.doc Document PROYECTO BIOTECNOLOGIA.doc (D9865724)		6
W	URL: https://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/230301-La-importancia-del-sustra... Fetched: 10/7/2020 4:53:00 PM		1



Firmado electrónicamente por:
PATRICIO
ALEJANDRO PEREZ
GUERRERO

Ing. Patricio Pérez Guerrero PhD.
Director de tesis



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “Efecto de dos dosis de micorrizas y dos tipos de sustratos en la aclimatación de plántulas in vitro de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)” fue realizado por la señorita **Moposita Lasso, Evelyn Viviana** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 07 de octubre del 2020

Firma:



Firmado electrónicamente por:
PATRICIO
ALEJANDRO PEREZ
GUERRERO

Ing. Pérez Guerrero, Patricio Alejandro PhD.

CC: 1802941011



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Evelyn Viviana, Moposita Lasso**, con cédula de ciudadanía n° 171829345-7, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Efecto de dos dosis de micorrizas y dos tipos de sustratos en la aclimatación de plántulas in vitro de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 07 de octubre del 2020

Firma:

Una firma manuscrita en tinta azul que parece leer 'Evelyn Viviana Moposita Lasso'.

.....
Moposita Lasso, Evelyn Viviana

C.C.: 171829345-7



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Moposita Lasso, Evelyn Viviana**, con cédula de ciudadanía n° 171829345-7, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Efecto de dos dosis de micorrizas y dos tipos de sustratos en la aclimatación de plántulas in vitro de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 07 de octubre del 2020

Firma:

.....

Moposita Lasso, Evelyn Viviana

C.C.: 171829345-7

Dedicatoria

A mi eterna mamacita, Elena, el ángel más bonito que me cuida cada día desde el cielo, quien siempre será el pilar fundamental de mi vida y el motivo de todos mis logros.

A mi madre, Nelly, con su amor incondicional ha forjado en mí la empatía y la fuerza para nunca rendirme, y ha sembrado en mí el deseo constante de siempre superarme.

A mi padrastro, Carlos, y mis hermanos, Carlitos y Sofy, con su cariño, amor y sonrisas, me han enseñado lo valioso de la vida, con su apoyo me han ayudado a no decaer.

A mis tías, Rosita y Susy, que desde pequeña me han cuidado a pesar de la distancia, me han motivado a materializar mis sueños dándome ánimo en cada paso.

A mis primas Mirian, Vane y Mile que me han brindado siempre su cariño y amor, permaneciendo en los momentos más felices como los más tristes de mi vida.

A mis mejores amigos, Dani, Xavier y Luis Miguel, que nunca han dudado en brindarme su apoyo y ayuda, con su cariño me han enseñado que la amistad verdadera existe.

Agradecimientos

Agradezco a Dios, a la virgen María, a mi pequeña y hermosa familia por permitirme estar aquí y cumplir esta meta, porque gracias a ellos lo he logrado, son la fuente de mi inspiración y mis ganas de seguir adelante cada día, me han enseñado a valorar los pequeños detalles de la vida, ustedes son mi mayor orgullo y lo más valioso de este mundo, gracias por nunca dejarme sola.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y a la mejor carrera de Ingeniería Agropecuaria, IASA I, por enseñarme un amor único por la naturaleza y el campo. Gracias a todos los docentes excepcionales, que me transmitieron sus más preciados conocimientos.

Al Dr. Patricio Pérez, por sus enseñanzas, su paciencia y su valioso apoyo en este proyecto, además de ser un excelente docente, es una extraordinaria persona, gracias por creer en mí. Es un ejemplo de profesor y sin usted esta investigación no hubiese culminado con éxito.

Al Dr. Darwin Rueda, Ing. Pablo Landázuri e Ing. Gustavo Naranjo, revisores y técnico de laboratorio respectivamente en mi trabajo de titulación, gracias por su infinita paciencia, ayuda e intachable voluntad que me permitieron ejecutar esta investigación. Su apoyo y calidad profesional me inspiraron a no decaer.

A mis amigos, que han hecho de mis estudios universitarios una maravillosa experiencia, al haber compartido risas, lágrimas y cientos de aventuras. Gracias a ellos me llevo los mejores momentos y recuerdos, especialmente a Andre y Luis Miguel, a quienes considero unas personas únicas y excepcionales.

Gracias a todas las personas que sumaron experiencias en mi vida universitaria.

Índice de Contenido

Portada	1
Urkund.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Contenido	8
Índice de Tablas	12
Índice de Figuras.....	13
Resumen	14
Abstract.....	15
Capítulo I.....	16
Introducción	16
Objetivos.....	18
<i>General</i>	18
<i>Específicos</i>	18
Hipótesis	18

Capítulo II.....	19
Revisión de Literatura	19
Generalidades del Mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth)	19
<i>Clasificación taxonómica y Descripción morfológica</i>	19
<i>Origen y Distribución en el Ecuador</i>	20
<i>Importancia</i>	21
<i>Propagación vegetativa</i>	21
Cultivo de tejidos vegetales.....	22
<i>Generalidades</i>	22
<i>Micropropagación</i>	23
<i>Cultivo in vitro en Vaccinium</i>	29
Micorrizas.....	34
<i>Generalidades de las micorrizas</i>	34
<i>Glomus intraradices</i>	36
<i>Importancia y beneficios de las micorrizas</i>	37
Sustratos para plantas.....	38
<i>Generalidades de los sustratos para plantas</i>	38
<i>Tipos de sustratos para el género Vaccinium</i>	39
Capítulo III	41
Materiales y Métodos.....	41

	10
Ubicación de la investigación.....	41
<i>Ubicación política</i>	41
<i>Ubicación geográfica</i>	41
Métodos.....	43
<i>Manejo de plantas madre de Vaccinium floribundum Kunth</i>	43
<i>Preparación del medio de cultivo</i>	44
<i>Recolección y desinfección del material vegetal</i>	47
<i>Introducción del cultivo in vitro</i>	48
<i>Preparación de mezcla de sustratos</i>	50
<i>Enraizamiento ex vitro y aclimatación</i>	51
Diseño experimental.....	54
<i>Factores</i>	54
<i>Tratamientos</i>	54
<i>Tipo de diseño</i>	55
<i>Croquis del diseño experimental</i>	55
<i>Análisis estadístico y funcional</i>	55
Capítulo IV.....	57
Resultados y Discusión.....	57
Evaluación del porcentaje de contaminación y oxidación fenólica in vitro.....	57
Evaluación del porcentaje de supervivencia, brotación y tamaño de brotes en la fase in vitro.	60

	11
Evaluación del porcentaje de supervivencia y contaminación en la fase de aclimatación.....	62
Evaluación del tiempo de supervivencia en la fase de aclimatación	64
Capítulo V.....	69
Conclusiones y Recomendaciones.....	69
Conclusiones.....	69
Recomendaciones.....	70
Bibliografía	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Clasificación taxonómica de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth</i>	19
Tabla 2 <i>Clasificación taxonómica de <i>Glomus intraradices</i></i>	36
Tabla 3 <i>Medios utilizados en la investigación: Woody Plant Modificado de Lloyd & McCown y Murashige & Skoog</i>	46
Tabla 4 <i>Proceso de aclimatación para <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth en cámara húmeda</i>	52
Tabla 5 <i>Descripción de tratamientos usados en la investigación</i>	54
Tabla 6 <i>Análisis de varianza para un DCA factorial 2x2 con 12 repeticiones</i>	56
Tabla 7 <i>Variables, número y porcentajes de explantes evaluados en la fase in vitro de mortíño durante 6 semanas</i>	57
Tabla 8 <i>Porcentaje de supervivencia y contaminación por tratamientos</i>	63
Tabla 9 <i>Nivel de significancia del tiempo de supervivencia de las plántulas de mortíño a los 45 días después del trasplante en dos sustratos y dos dosis de micorrizas</i>	65
Tabla 10 <i>Promedio \pm error estándar del tiempo de supervivencia a los 45 días después del trasplante, en la aclimatación de mortíño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunt)</i>	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Mortiño (Vaccinium floribundum Kunt)</i>	20
Figura 2 <i>Micropropagación: etapas y métodos</i>	29
Figura 3 <i>Raíz colonizada por Glomus intraradices</i>	37
Figura 4 <i>Ubicación de la parcela de mortiño en Pailones de la Hacienda El Prado</i>	42
Figura 5 <i>Ubicación del Laboratorio de Agrobiotecnología de la Hacienda El Prado</i>	43
Figura 6 <i>Aspersión de fungicidas y fertilizantes de plantas madre de Vaccinium floribundum Kunth</i>	44
Figura 7 <i>Elaboración de medio de cultivo para Vaccinium floribundum Kunth</i>	45
Figura 8 <i>Recolección y desinfección del material vegetal de mortiño</i>	48
Figura 9 <i>Introducción del cultivo de mortiño in vitro</i>	49
Figura 10 <i>Preparación de tratamientos</i>	51
Figura 11 <i>Enraizamiento ex vitro y aclimatación</i>	53
Figura 12 <i>Contaminación y oxidación fenólica de explantes de mortiño en etapa in vitro de 6 semanas</i>	58
Figura 13 <i>Explantes in vitro de Vaccinium floribundum Kunth</i>	58
Figura 14 <i>Explantes de mortiño in vitro</i>	61
Figura 15 <i>Porcentaje de supervivencia y contaminación por tratamiento</i>	63
Figura 16 <i>Plántula de mortiño contaminada con Cladosporium en sustrato dos</i>	64
Figura 17 <i>Plántulas de mortiño a los 45 días después del trasplante</i>	66

Resumen

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), es una especie silvestre endémica de los páramos ecuatorianos, el estudio de su propagación y aclimatación es fundamental para evitar su extinción. En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto de dos dosis de micorrizas y dos tipos de sustratos en la aclimatación de plántulas de mortiño producidas por medio de cultivo de tejidos, las cuales generaron cuatro tratamientos: T1: 40% Cascarilla de arroz + 40% Tierra negra + 20% Pomina y 75 g.L⁻¹ de micorrizas, T2: 40% Cascarilla de arroz + 40% Tierra negra + 20% Pomina y 100 g.L⁻¹ de micorrizas, T3: 50% Turba rubia + 30% Fibra de coco + 20% Pomina y 75 g.L⁻¹ de micorrizas y T4: 50% Turba rubia + 30% Fibra de coco + 20% Pomina y 100 g.L⁻¹ de micorrizas. Se determinó en la etapa in vitro una supervivencia de los explantes de 78,67% con medio basal ½ Murashige & Skoog y ½ Woody Plant Medium modificado + 4 mg. L⁻¹ de zeatina, además 8% de contaminación, 13,33% de oxidación fenólica y 64% de brotación a las 6 semanas del cultivo. Los cuales fueron sometidos a la etapa aclimatación ex vitro, por consiguiente, en el tratamiento 4 se obtuvo la mayor supervivencia con un 66,67%. Se evaluó, además el tiempo de supervivencia con un Diseño completamente al azar (D.C.A.) factorial 2x2, con 12 repeticiones, el mejor resultado pertenece al sustrato 2 con 39,79 días ($F_{1,44}=11,03$; $p=0,0018$), de modo que la dosis de micorrizas sobre la variable de respuesta no fue significativa ($F_{1,44}=0,04$; $p=0,8418$). Concluyendo que el tipo de sustrato incide sobre la supervivencia de *Vaccinium floribundum* Kunth en la fase de aclimatación, además se desarrolló con éxito protocolos para la micropropagación in vitro y aclimatación para el mortiño.

Palabras Clave: Micropropagación, Micorrizas, Sustratos

Abstract

The mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), is a wild species endemic to the Ecuadorian moors, the study of its propagation and acclimatization is essential to avoid its extinction. In the present research work, the effect of two doses of mycorrhizae and two types of substrates on the acclimatization of mortiño seedlings produced by means of tissue culture was evaluated, which generated four treatments: T1: 40% Rice husk + 40% Black earth + 20% Pomina and 75 g.L⁻¹ of mycorrhiza Humipower, T2: 40% Rice husk + 40% Black earth + 20% Pomina and 100 g.L⁻¹ of mycorrhiza Humipower, T3: 50% Turbid blonde + 30% Coconut fiber + 20% Pomina and 75 g.L⁻¹ of mycorrhiza Humipower and T4: 50% Turbid blonde + 30% Coconut fiber + 20% Pomina and 100 g.L⁻¹ of mycorrhiza Humipower. In the in vitro stage a survival of the explants of 78.67% was determined with ½ Murashige & Skoog basal medium and ½ Woody Plant Medium modified + 4 mg. L⁻¹ of zeatin, in addition to 8% contamination, 13.33% phenolic oxidation and 64% sprouting at 6 weeks of cultivation. They were subjected to the ex vitro acclimatization stage, therefore, in treatment 4 the longest survival was obtained with 66.67%. In addition, the survival time was evaluated with a 2x2 factorial design completely up (D.C.A.), with 12 repetitions, the best result belongs to substrate 2 with 39.79 days ($F_{1,44} = 11,03$; $p = 0,0018$), so that the mycorrhizal dose on the response variable was not significant ($F_{1,44} = 0.04$; $p = 0.8418$). Concluding that the type of substrate affects the survival of *Vaccinium floribundum* Kunth in the acclimatization phase, in addition, protocols for development in micropropagation was accessed and infected for the mortiño.

Keywords: *Micropropagation, Mycorrhiza, Substrates*

Capítulo I

Introducción

El trabajo presentado aborda el cultivo de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), el cual es una especie autóctona de los Andes, que se desarrolla en altitudes de 2500 a 4300 msnm y que produce en los meses de agosto a noviembre. Esta y otras plantas nativas fueron la base de alimentación de muchas familias indígenas, a pesar de la fuerte invasión de nuevas especies vegetales, las familias ecuatorianas aún lo siguen consumiendo, especialmente para fechas como el 02 de noviembre, “Día de los difuntos” (Coba et al., 2012).

Sin embargo, a causa de actividades como el sobrepastoreo, la quema de zonas verdes y la deforestación, la diversidad genética de estas especies endémicas se han visto afectadas a lo largo del tiempo. En el Ecuador no existen plantaciones comerciales del mortiño, por lo cual es conveniente estudiar la domesticación de esta especie y fomentar el cuidado de la flora y fauna de los páramos (Chamorro, 2019).

Los factores para su multiplicación y conservación son limitantes, debido a la inexistencia de un protocolo de propagación, investigación más profunda e insumos que protejan a la planta de plagas y enfermedades. Su propagación es a través de semillas, esquejes y estacas, cuando se utilizan semillas se ha determinado que el porcentaje de germinación es bajo, mientras tanto para esquejes y estacas el enraizamiento es lento y también depende del genotipo para que se desarrolle adecuadamente, por ello se tuvo la necesidad de introducir herramientas biotecnológicas para su multiplicación y diversificación (Vallejo, 2008).

Castro-Restrepo & Álvarez-Guzmán (2013), manifiestan que la micropropagación de especies leñosas se ha vuelto frecuente, se han observado problemas como la contaminación y la baja respuesta morfológica cuando se trata de especies que crecen en su entorno natural, aun

así se ha logrado la regeneración de brotes a partir de meristemas en *V. corymbosum* y *V. vitis idaea* con diferentes dosis de citoquininas (zeatina y 2-isopentil adenina), utilizando el enraizamiento ex vitro bajo condiciones de cámara húmeda.

Trujillo (2008) realizó un estudio en *Vaccinium floribundum* en Ecuador, donde se utilizó un medio basal sin hormonas, Woody Plant Medium modificado (mWPM), obteniendo 60.7% de semillas germinadas a los 30 días. Cabe mencionar que la aclimatación de las plantas de mortifio cultivadas in vitro aún no está estandarizada, ya que al finalizar el estudio la mayoría de plantas murieron al no contar con raíces funcionales. Una investigación realizada por Meneses, et al. (2018), consiguió un 61% de germinación en medio Murashige & Skoog (MS) a los 80 días. Jimenez (2004), afirma que el tiempo aproximado para obtener explantes de 3 a 5 cm es de 8 meses en medio MS, además que al realizar subcultivos presentan menor vigorosidad y gran mortalidad en el proceso.

Es necesario indicar que la micropropagación en la mayoría de estudios de la especie *Vaccinium floribundum*, se ha concentrado en las semillas, el cual tarda un tiempo aproximado de 8 meses para su subcultivo, tomando en cuenta que existe el riesgo de una gran variabilidad genética, y no se ha obtenido supervivencia al finalizar la fase de aclimatación. Por ello en este estudio se propone el uso de yemas axilares jóvenes provenientes de plantas madre con un seguimiento adecuado, además de un protocolo para su aclimatación que aumente la supervivencia de las plántulas, con ayuda de micorrizas y diferentes sustratos, partiendo de estudios como Noboa (2010), donde la inoculación en las plantas con hongos micorríticos en vivero generó un mayor crecimiento vegetativo y radical, producto de la simbiosis en *V. corymbosum*, las micorrizas facilitaron el desarrollo de las estacas en el suelo.

Objetivos

General

Evaluar el efecto de dos dosis de micorrizas y dos tipos de sustratos en la aclimatación de plántulas in vitro de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).

Específicos

- Determinar el porcentaje de supervivencia en los procesos de micropropagación y aclimatación de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).
- Desarrollar un protocolo de micropropagación in vitro y aclimatación de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).

Hipótesis

H₀. “La supervivencia de las plántulas mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) in vitro bajo el efecto de micorrizas y sustratos en la fase de aclimatación no incremento.”

H₁. “La supervivencia de las plántulas mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) in vitro bajo el efecto de micorrizas y sustratos en la fase de aclimatación incremento.”

Capítulo II

Revisión de Literatura

Generalidades del Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

Clasificación taxonómica y Descripción morfológica

Coba et al. (2012), mencionan que el mortiño pertenece a la siguiente clasificación taxonómica:

Tabla 1

Clasificación taxonómica de Vaccinium floribundum Kunth

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Nombre Científico	<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth
Sinonimia	<i>Vaccinium mortinia</i>

Nota. Adaptado de: Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional, (pp.3), por Coba et al. (2012), La Granja.

Coba et al. (2012) lo describen como un arbusto ramificado cuya altura llega hasta 2.5 metros, de hojas muy pequeñas con el margen aserrado o crenado, nervación pinnada, flores de menos de 1 cm, solitarias o en racimos; tubo del cáliz articulado o no con el pedicelo, hipanto globoso, 5 lóbulos lanceolados; corola urceolada, blanca o rosada, con 5 lóbulos reflexos, estambres de 8 a 10, del mismo largo que el tubo de la corola, filamentos libres, anteras con túbulos cortos, dehiscencia apical poricida; ovario ínfero, locular, estilo ligeramente más largo

que el tubo de la corola. El fruto es una baya esférica de 5 a 8 mm de diámetro de color azul y azul oscuro, lisa y a veces glauca.

Figura 1

Mortiño (Vaccinium floribundum Kunt)



Nota. La figura 1 muestra una planta de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt) de la parcela en la Hacienda “El Prado”.

Origen y Distribución en el Ecuador

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos ha registrado una sola especie: *Vaccinium floribundum* en Ecuador (Ramírez & Williams, 2003), sin embargo, datos del Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, indican que se encuentran registradas tres especies de mortiño, las cuales son: *Vaccinium distichum*, *Vaccinium crenatum*, y *Vaccinium floribundum*, siendo esta última la especie más común. El mortiño (*Vaccinium floribundum*), de la familia Ericaceae, llamado también uva de monte, es una fruta nativa de los páramos ecuatorianos (Loján, 2003). Crece en las partes altas de la cordillera desde los páramos del Ángel en el Carchi hasta Tambo en Cañar, además se conocen datos proporcionados por el Parque Nacional Cotopaxi que ubican a la zona de adaptación del mortiño desde los 1000 msnm, hasta

los 4500 msnm, pero la realidad es que son pocos los páramos que poseen un número considerable de plantas, debido a la extensión de las áreas agrícolas que ha relegado a esta especie a zonas de páramo comprendidas entre los 3500 hasta los 4500 msnm en base a colectas realizadas *Vaccinium floribundum* se encuentra en la Sierra en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja (Coba et al., 2012).

Importancia

Partiendo de los análisis bromatológicos realizados en el Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP y análisis desarrollados por la FDA se determinó que el mortiño por su alto contenido de vitamina C (106,1 mg/100 g) y la presencia de antocianinas (5 %/100 g), es un indicador de su funcionalidad como antioxidante celular. Por su sabor agradable y cítrico fue un fruto muy apetecido en la dieta de nuestras etnias, los registros de etnomedicina resaltan su importancia medicinal por sus propiedades curativas a nivel del sistema gastrointestinal y sanguíneo. El mortiño presenta varias posibilidades agroindustriales, considerando sus diversos usos ya sean culinarios (pastelería, vinos, helados y la tradicional colada morada) o sus usos industriales empleados en la fabricación de tintes, tinturas y combustibles. Para finalizar el arbusto tiene vital importancia por su actividad regeneradora de sitios quemados, la cual se emplea en la reforestación de los páramos, contribuye a la protección de aves silvestres, suelos agrícolas y fuentes de agua (Coba et al., 2012).

Propagación vegetativa

Propagación sexual

Esta técnica posee alta variabilidad genética debido a que su propagación se la realiza por medio de la semilla, por lo tanto, su descendencia es variada y los individuos nuevos son

diferentes a la planta madre. También las características de resistencia entre otras son transferidas a las plantas en diferente proporción para su supervivencia (Urbina, 2009). Para lograr un porcentaje de germinación aceptable debemos conocer el tipo de semilla que usaremos, existen semillas ortodoxas (toleran el secado) y las semillas recalcitrantes (no toleran el secado). La semilla del mortiño *Vaccinium floribundum* es una semilla recalcitrante ya que no es apta para el secado (Correa & Jácome, 2015).

Propagación asexual

La propagación asexual se lo realiza a través de yemas, raíces, esquejes y bulbos entre otros métodos. Esto es posible debido a que las plantas tienen una gran capacidad de regeneración, produciendo clones de la planta madre con una descendencia uniforme, es decir plantas idénticas. Este método asegura la conservación del genotipo, pero también existen otros factores que intervienen en su producción como las enfermedades patógenas y mutaciones (González & Rodríguez, 2009).

En la investigación de (Brenes, 2014), habla acerca de la Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (*Vaccinium* spp.) a partir de segmentos foliares, confirmando que los arándanos se propagan comercialmente de manera vegetativa (estacas de tallo leñosas o herbáceas). Esta técnica ha permitido la expansión del cultivo a gran escala, en menor tiempo y con menor presencia de enfermedades por agentes patógenos.

Cultivo de tejidos vegetales

Generalidades

Patiño (2012), destaca que es un método distinto en comparación a las técnicas convencionales utilizadas de producción vegetal, conocido también como “cultivo in vitro de

plantas”, por realizar su proceso en material de vidrio, aunque en la actualidad se utilizan diversos materiales para contener el medio artificial que puede ser sólido o líquido.

En estos procedimientos se cultivan plantas bajo condiciones controladas y libres de microorganismos. Entre los tipos de técnicas que abarca el cultivo in vitro de plantas están el rescate de embriones, el cultivo de protoplastos, el cultivo de callos y el cultivo de órganos, entre otros. Hoy en día, estos conjuntos de técnicas sirven como herramientas para la propagación y mejoramiento de plantas (Trujillo, 2008). La eficiencia en lograr estos propósitos y el tipo de resultado que se obtiene in vitro depende de varios factores como: el ambiente químico (medio de cultivo, pH) y ambiente físico (temperatura, luz y humedad), que afectan el crecimiento de las plantas (Castillo, 2004).

Micropropagación

Es una técnica de propagación muy utilizada para la producción de individuos libres de patógenos y características específicas para el ámbito económico, ya que se produce plantas de calidad uniforme para la demanda comercial, las ventajas es que este cultivo puede realizarse en espacios pequeños, donde se controla el ambiente en el que se va a desarrollar las plantas, por lo que es independiente de las estaciones de año y variación de climas (Malajovich & Soares, 2004). Se la conoce también como propagación clonal por cultivo in vitro, utilizada para la difusión masiva de plantas como: frutales, ornamentales, forestales, hortícolas, etc. (Sagretín, 2006).

Castillo (2004) da a conocer que los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se determina la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C o de acuerdo a la especie estudiada, además de controlar la cantidad de horas de luz.

Chamorro (2019) manifiesta que los medios de cultivos vegetales tienen todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo normal de la planta, entre ellos están principalmente compuestos de:

Sales Inorgánicas: Los macro-nutrientes son esenciales para el desarrollo de la planta, entre los más importantes son los siguientes: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Azufre (S), Calcio (Ca), Magnesio (Mg). Los micro-nutrientes son elementos esenciales, pero se encuentran en pequeñas cantidades, los más importantes son: Hierro (Fe), Cobalto (Co), Zinc (Zn), Molibdeno (Mo) y Boro (B). Se conoce que el uso de dosis altas y el exceso de estos elementos podría causar toxicidad en los explantes produciendo la pérdida de los mismos (Recto, 2018).

Entre los medios de cultivo más utilizados en los estudios son: Knudson (1946), MS (Murashige y Skoog, 1962), White (1963), B5 (Gamborg, 1970-1976), WPM (Lloyd y McCown 1980) y KM8p (Kao y Michayluk 1982) (UDL, 2020).

Fuentes de Carbono: Son fuentes de energía para la planta, los más relevantes son la sacarosa y glucosa, estos son fuente de elementos importantes como el Carbono (C), Hidrógeno (H) y Oxígeno (O). El crecimiento y desarrollo normal de la planta depende de estos compuestos, los que se producen de manera natural en el proceso de la fotosíntesis (Puche, 2012).

Vitaminas: Son compuestos orgánicos que facilitan el proceso de división celular y crecimiento de la planta, su función es de catalizadores y metabólicos. Las más importantes y utilizadas son: Tiamina, Piridoxina y ácido nicotínico (Recto, 2018)

Reguladores de crecimiento: Son compuestos químicos que intervienen en el crecimiento y desarrollo de la planta, se divide en:

- **Auxinas:** Son hormonas que forman parte del proceso de la diferenciación de raíces y la división celular, por lo tanto, ayudan a que la célula se pueda expandir debido a la plasticidad de la pared celular (Chamorro, 2019).

Báez-Pérez (2015), mencionan que una auxina muy utilizada en la propagación de esquejes, estacas y acodos es IBA (Ácido indol butírico), el cual tiene como función principal promover y acelerar la formación de raíces adventicias. Esta hormona ha sido utilizada con anterioridad como un promotor del crecimiento de raíces en plantas ornamentales y frutales, debido a que estimula la formación de raíces laterales y resulta ser un efecto muy deseado en el desarrollo de las plantas.

- **Citoquininas:** Son hormonas que facilitan los procesos de formación de brotes laterales, síntesis de proteínas, inducen a la formación de tallos y yemas, por otro lado, retarda el proceso de degeneración celular, iniciación del desarrollo de cloroplastos, fotosíntesis y la expansión de cotiledones (Chamorro, 2019).

Una de las citoquininas más utilizadas es la zeatina, la cual tiene como función principal estimular la división celular en tejidos no meristemáticos, que se sintetiza en los plastidios y es transportada por el xilema. La zeatina se puede encontrar en el maíz y sus mayores concentraciones se están en embriones y frutas jóvenes en desarrollo, ambos considerándose de rápida división celular; la presencia de altos niveles de esta fitohormona puede ayudar y facilitar su habilidad de actuar como una fuente demandante de nutrientes en la planta (García, 2015).

- **Giberelinas:** Son hormonas que influyen directamente en procesos como: germinación de semillas, desarrollo y crecimiento de raíces, la elongación del tallo y sus entrenudos, la floración y crecimiento meristemático (Recto, 2018).

Fases de la micropropagación

Castillo (2004), considera dentro del proceso de micropropagación las siguientes fases:

Fase 0: Preparación de la planta madre

Se deben obtener explantes con un apropiado nivel nutricional, sanitario y grado de desarrollo, para lograr establecer un cultivo adecuado y en condiciones de total asepsia. En consecuencia, es recomendable mantener un periodo de dos semanas o varios meses en las plantas madre en un invernadero donde sus condiciones sanitarias, riego y nutrición son controladas. Las plantas madre que permanecen en un ambiente protegido cumplen con los criterios de calidad para ser micropropagadas, características como un crecimiento vigoroso y constante de ramas vegetativas y florales, buena producción de frutos y flores, libres de enfermedades (Castillo, 2004).

Fase 1: Desinfección del material vegetal

Cuando ya se selecciona la planta madre, se toma parte de ella en pequeños fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes (yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc.). Para eliminar los contaminantes externos que podrían estar presentes en los explantes se realizará una desinfección de los fragmentos o partes de planta madre antes de su introducción en el medio de cultivo (Castillo, 2004).

Olmos (2016), informa que la desinfección superficial en la mayoría de ensayos es mediante el uso de: alcohol al 70%, seguido de 0,5 hasta 1,5 % de Hipoclorito de sodio, unas gotas de yodo y el uso de fungicidas de acuerdo con el cultivo. La mayoría de ocasiones los patógenos se encuentran latentes aun después de la desinfección superficial, estos aparecen posteriormente y son identificados rápidamente a las dos semanas mediante la observación de infecciones por bacterias u hongos, debido a que logran sobrevivir dentro del sistema vascular,

este tipo de patógenos pueden ser controlados en el medio de cultivo con el empleo de diferentes dosis de fungicidas y antibióticos que no sean tóxicos para los explantes.

Fase 2: Introducción del material in vitro

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material utilizado, se colocan en condiciones asépticas en el medio de cultivo estéril formulado para la planta. El inicio del ciclo de cultivo in vitro comienza en un período de una semana o quince días, donde el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales puede ser observado (Castillo, 2004).

Uno de los principales problemas que presentan los explantes en la fase de introducción es la oxidación de los compuestos fenólicos, producidos como respuestas de estrés ocasionadas por la manipulación, daño mecánico y uso de desinfectantes. La producción de compuestos fenólicos inhibe el crecimiento y desarrollo adecuado del explante e inclusive pueden causar su muerte. Para prevenirlo es recomendable emplear compuestos que absorben fenoles, como el carbón activado en el medio de cultivo o mantener a los explantes en soluciones con antioxidantes como el ácido ascórbico o ácido cítrico hasta el momento de la siembra (Olmos et al., 2016).

Fase 3: Multiplicación de los brotes

Esta fase pretende aumentar el número de brotes por explante, para conservar la fidelidad genética del cultivo se emplea los meristemas o yemas ya brotadas en la fase de introducción, esta etapa dependerá de las dosis y combinaciones de las hormonas de crecimiento, por ello las citoquininas son las seleccionadas en esta fase para promover el desarrollo óptimo de los brotes, inhibiendo la dominancia apical del explante (Cano, 2013).

Fase 4: Enraizamiento de los explantes

En esta fase se incrementa el uso y la dosis de auxinas para lograr la producción de raíces adventicias (Cano, 2013). Esta etapa se puede ejecutar de manera in vitro o ex vitro, en especies leñosas la formación de raíces adventicias suele ser un proceso más complejo puesto que presenta una limitada capacidad rizogénica a comparación de las especies herbáceas (Olmos et al., 2016)

Fase 5: Aclimatación de los explantes

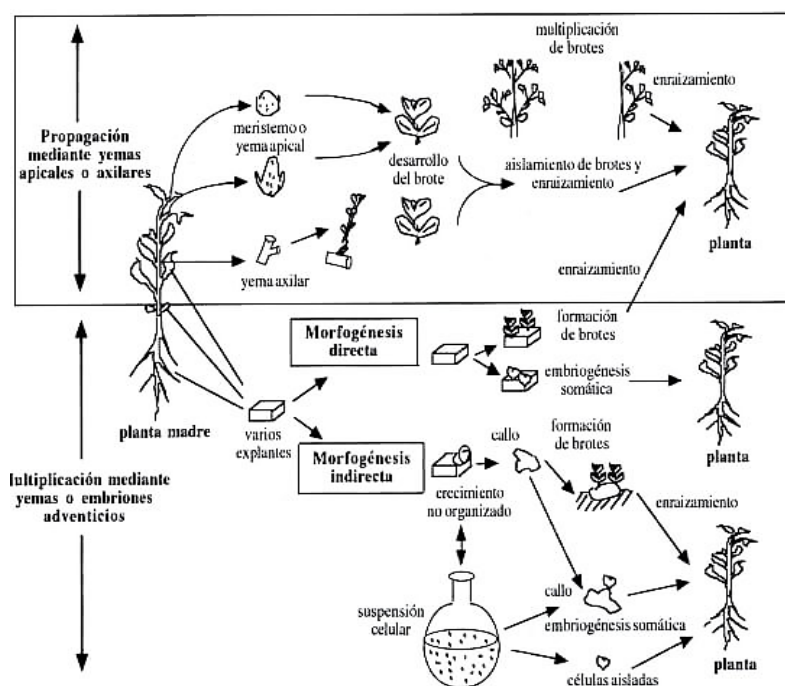
Esta etapa es donde finaliza el proceso de micropropagación, el éxito o el fracaso depende de la adaptación y la tasa de supervivencia de las plantas, por ello es recomendado el uso de cámaras de crecimiento óptimas según la especie, donde se puedan controlar los factores ambientales (Castillo, 2004). En esta etapa es fundamental el control de factores como la temperatura, luz y humedad relativa de manera moderada ir aumentando o disminuyendo, logrando una adaptación progresiva (Olmos et al., 2016).

Castillo (2004), recomienda para el trasplante elegir un sustrato suelto, poroso, con mezcla de arena, turba y cáscara de arroz quemado, los cuales podrían permitir un desarrollo y crecimiento de raíces muy rápido. Las mezclas de sustratos son diferentes y muy variadas de acuerdo a la especie con la que se trabaje.

Esta secuencia de fase o etapas indica el ciclo completo de la multiplicación in vitro de plantas, puede ser aplicada o adecuada a diferentes especies vegetales, en cada caso se podrán incluir simplificaciones o cambios de acuerdo a las características de las plantas a estudiar (Castillo, 2004).

Figura 2

Micropropagación: etapas y métodos



Nota. Adaptado de: Técnicas de cultivo in vitro, (pp.59), por Linsey y Jones (1989) citado por Intagri (2020), Plant Biotechnology in Agriculture.

Cultivo in vitro en Vaccinium

Alhuja (1992) considera que el cultivo in vitro de plantas leñosas presenta varias dificultades frente a plantas herbáceas, muchas especies resultan ser recalcitrantes. Por lo general se ha visto que con tejidos juveniles se tiene mayor éxito, como también influye el genotipo, el tipo de tejido y la estación o época del año en que se obtiene el explante. Otra observación es que las plantas leñosas suelen ser sensibles a las altas concentraciones de nutrientes (Murashige & Skoog) en el medio de cultivo, por lo que Lloyd y McCown formularon el Woody Plant Medium (WPM) con concentraciones más bajas de ciertas sales, por ello el medio de cultivo que se usa comúnmente en la propagación de *Vaccinium* es el WPM o modificaciones de éste (Debnath, 2006). Sin embargo, Tetsumura (2008) investigó el efecto de

diferentes medios en la propagación y encontró que después de numerosos subcultivos, las plantas de blueberry propagadas en WPM empezaron a tornarse rojas por una falta de nitrógeno o micronutrientes. En cambio, el medio Murashige Skoog produjo vitrificación, posiblemente por un exceso de iones de amonio, una mezcla de WPM y MS permitió un crecimiento óptimo (Murashige & Skoog, 1962).

Se ha llevado a cabo un gran número de estudios sobre la propagación in vitro de diversas especies del género *Vaccinium*. Se ha visto que la eficiencia de la propagación es influenciada por el balance y tipo de reguladores de crecimiento y por el tipo de medio de cultivo que se utiliza. En los estudios que se han hecho con especies de *Vaccinium*, se reporta que las plantas producidas por el cultivo in vitro tienen un crecimiento vigoroso y superior en el campo frente a plantas propagadas por métodos tradicionales (Debnath, 2006).

Propagación in vitro de *Vaccinium*

Para la propagación in vitro en el estudio de Castro-Restrepo & Álvarez-Guzmán (2013) se encontró eficacia al utilizar 30 g.L⁻¹ de sacarosa en la especie *Vaccinium meridionale*. En cuanto al pH del medio, éste es un factor que puede afectar a la proliferación de retoños y la formación de raíces; las especies de *Vaccinium* son acidófilas, y se ha comprobado tener una efectiva multiplicación a un pH de 5.0 y una menor a un pH 3.0 en la especie *Vaccinium corymbosum* (Ostrolucká et al., 2004).

Se ha utilizado generalmente la hormona zeatina o el 2iP en varios protocolos de propagación de especies de *Vaccinium* (Ostrolucká et al., 2004). Así también para la multiplicación de lingonberry y milberry, Jaakola (2001) propone el uso de dos medios: MS modificado con 2iP (5 mg.L⁻¹) o con BAP, 6-benzylaminopurine, (0.1mg.L⁻¹) y NAA (0.05mg.L⁻¹), donde las semillas germinaron en ambos medios pero no se dio multiplicación en MS

modificado con BAP y NAA, mientras que en el medio con 2iP, se vio multiplicación después de 2 meses.

La eficacia de las hormonas usadas en la fase de multiplicación generalmente varía según el cultivar o especie de *Vaccinium*. Así que no hay un consenso sobre una mayor eficacia de la zeatina o el 2iP para la producción de retoños de buena calidad (Ostrolucká et al., 2004).

Los ciclos de proliferación de *Vaccinium meridionale* tardaron entre 6 y 9 semanas de cultivo; datos similares fueron obtenidos por Jaakola et al. (2001), quienes determinaron que para la multiplicación de explantes de *Vaccinium myrtillus* y *Vaccinium vitis-idaea*, usualmente son necesarias 5 a 8 semanas de cultivo (Rache-Cardenal & Pacheco-Maldonado, 2010).

En las plantas leñosas, hay cierta tendencia de algunas especies de empeorar en su estado fisiológico después de varios subcultivos. Entre las anormalidades que se presentan están la hiperhidricidad o una necrosis apical. Como resultado, la intensidad de proliferación se puede ver afectada a largo plazo (Gonzales et al., 2000).

Introducción de yemas axilares de *Vaccinium*

Castro-Restrepo & Álvarez-Guzmán (2013) sugieren en su estudio de *Vaccinium meridionale*, utilizar explantes de 10 a 15 cm de longitud los cuales para su desinfección se dejó en inmersión durante 24 horas en una solución de dióxido de cloro (2%), luego se sumergió en etanol (70%) por un minuto, después en hipoclorito de sodio (1%) durante 5 minutos, y posteriormente, en nitrato de plata 0,5% (p/v) por 5 minutos, finalmente, se efectuaron tres lavados con agua destilada estéril. Para el medio de cultivo se solidificó con agar gel-rite (2,4 g.L⁻¹) se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 122 °C y 15 libras de presión, el pH se ajustó previamente a 5,5 con KOH. Los cultivos se incubaron a 21 °C con un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad. Como fuente de luz se utilizaron lámparas fluorescentes.

En el mismo estudio se observó que las contaminaciones por hongos y bacterias son los mayores problemas durante el establecimiento de explantes bajo condiciones in vitro. La utilización del carbendazim en el medio de cultivo disminuyó la presencia de hongos, con concentraciones de 0,05 y 0,1% y la contaminación por hongos disminuyó entre el 5 y el 2%. Este aspecto, es importante cuando se compara con el testigo (sin carbendazim) donde el porcentaje de contaminación fue del 45%. Además, Deberg, et al. (1993) encontraron que el producto no se degradó durante el proceso de esterilización y durante la fase de multiplicación no presentó efectos fitotóxicos hasta $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y que además puede presentar actividad similar a las citoquininas; estos resultados coincidieron al ensayo realizado ya que los brotes que se diferenciaron tuvieron un desarrollo normal y la supervivencia aumentó por efecto de una mayor asepsia durante el establecimiento (Castro-Restrepo & Álvarez-Guzmán, 2013).

Jaakola et al. (2001), indican que la iniciación del crecimiento in vitro de explantes de *Vaccinium* es muy limitada cuando se utilizan plantas de campo y, según Brisette et al. (1990) la causa principal es el alto grado de contaminación.

En cuanto a las hormonas más usadas para la introducción son el 2iP y la zeatina, en investigaciones con *Vaccinium* no se acostumbra probar BAP en ensayos de iniciación a partir de yemas por ser inefectivo para este propósito (Jaakola, 2001). Usar 2iP solo, en muchos casos resulta ser muy fitotóxico, y da como resultado un porcentaje muy bajo de iniciación de retoños o crecimiento estancado. La eficacia de la hormona depende de la interacción entre el genotipo y la citoquinina pero, al comparar entre hormonas, la zeatina usualmente resulta superior al 2iP para la introducción de yemas (Meiners et al., 2007).

Reed & Abdelnour-Esquivel (1991) sostienen el uso de zeatina, por su estudio en la introducción de yemas de 12 genotipos de *V. corymbosum*, donde la mayoría respondió mejor

con $4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zeatina que con 10 ó $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2iP, reconociendo la alta variabilidad del género *Vaccinium*, para la iniciación de cultivos in vitro.

Enraizamiento y aclimatación de *Vaccinium*

Durante el cultivo de plantas in vitro, las plantas crecen bajo condiciones que son óptimas para su crecimiento pero que conducen al desarrollo de anatomía, fisiología y morfología anormales. El sitio donde crecen generalmente tiene una humedad alta, baja cantidad de CO_2 e irradiación baja en comparación al campo, una de las consecuencias es que las plantas no tienen estomas funcionales o suficiente cera epicuticular que permitan una regulación eficiente de la transpiración (Noé & Bonini, 1996). Además, el medio a menudo tiene reguladores de crecimiento y sucrosa como fuente de energía para la planta (Pospíšilová et al., 1999).

Cuando se enraíza a las plantas de *Vaccinium* por métodos ex vitro, el procedimiento usual es sumergir la base de la planta en una solución de IBA, ácido indol-3-butírico, para luego colocar la planta en un sustrato. Éste generalmente contiene turba, perlita, y/o vermiculita y se coloca a la planta dentro de una cámara de humedad durante 1 a 4 meses hasta que enraícen las plantas ya que generalmente se obtiene un alto porcentaje de enraizamiento ex vitro (hasta 96%). Después del enraizamiento se prosigue a la aclimatación, bajando la humedad durante un período de 2 semanas hasta 2 meses (Noé & Eccher, 1994).

En el estudio realizado por Castro-Restrepo & Álvarez-Guzmán (2013), dan a conocer el enraizamiento ex vitro de los brotes en tres genotipos de *Vaccinium meridionale* tuvo lugar entre los 30 a 40 días después de ser colocados en el sustrato en condiciones de cámara húmeda. La concentración de $2.000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ permitió obtener el 82,7% de supervivencia para los tres genotipos. La altura de los brotes se incrementó cuando se empleó el AIB en comparación

con el testigo donde no se utilizó este regulador de crecimiento. El número de raíces no mostró diferencias significativas para los tratamientos evaluados. Las raíces de mortiño que se formaron con el tratamiento de 2.000 mg. L⁻¹ de AIB se caracterizaron por tener adecuado desarrollo lateral, abundante formación de raicillas y una corona que permite la emisión de brotes basales. Estas raíces juegan un papel importante en la rizosfera pues incrementa el área radical y disminuye el estrés durante la aclimatización. Después de esta fase, las plántulas desarrollaron una morfología de las hojas y brotes normales. Las plantas no han mostrado variaciones morfológicas detectables cuando se compararon con las plantas madres.

Debnath (2003) y Debnath & McRae (2001), consiguieron climatizar plantas de *Vaccinium vitis idaea* y de *Vaccinium macrocarpon* utilizando cubetas que colocaron en una cámara húmeda el proceso lo realizaron disminuyendo gradualmente la humedad durante 2-3 semanas en condiciones de invernadero.

Algunos investigadores como De Klerk (1990) y Litwinczuk & Szczerba (2005) deducen que los brotes adventicios que se desarrollan in vitro pueden ser la principal fuente de variación somaclonal y, por lo tanto, se deben descartar en los procesos de micropropagación.

Micorrizas

Generalidades de las micorrizas

Se conoce con el nombre de micorriza a la asociación mutualista establecida entre las raíces de la mayoría de las plantas y ciertos hongos del suelo. Se trata de una simbiosis prácticamente universal, casi todas las especies vegetales pueden ser micorrizadas y están presentes en la mayoría de los hábitats naturales. Las micorrizas son tan antiguas como las propias plantas y se conoce su existencia desde hace más de cien años; estimándose que

aproximadamente el 95% de las especies vegetales conocidas establecen de forma natural y constante este tipo de simbiosis con hongos del suelo (Quintana Roo, 2014).

Nogales Garcia (2006) expresa que existen tres tipos de micorrizas, que vienen definidas por la combinación planta/hongo y por la estructura simbiótica.

- **Ectomicorrizas:** se desarrollan intercelularmente dentro del córtex radical sin que se produzca una penetración intracelular. El hongo forma un manto de hifas alrededor de las raíces que se puede ver a simple vista.
- **Endomicorrizas o micorrizas arbusculares:** no forman un manto externo y el hongo penetra dentro de las células del córtex, produciéndose un intercambio de nutrientes en este nivel.
- **Ectendomicorrizas:** presentan características de ambos tipos (Mikola, 1965).

Las micorrizas arbusculares se encuentran presentes en la mayoría de las plantas ornamentales y hortícolas, así como en árboles frutales, cítricos y vid. Actualmente se considera que pertenecen a la División Glomeromicota (Schübler et al., 2001), con más de 150 especies descritas. De entre ellas, la familia Glomeraceae, con el género *Glomus*, es la que está representada por mayor número de especies (Nogales Garcia, 2006).

Glomus intraradices

La clasificación taxonómica según Hernández (2001) es la siguiente:

Tabla 2

Clasificación taxonómica de Glomus intraradices

Orden	Glomales
Suborden	Glominae
Familia	Glomaceae
Género	Glomus Tulasne & Tulasne
Especie	<i>Glomus intraradices</i> Schenck & Smith

Nota. Adaptado de: Efecto del hongo micorriza (*Glomus intraradices* Schenck & Smith)

en el crecimiento del portainjerto mexícola (*Persea americana* Mili) cultivado bajo cinco tratamientos de fertilización, (pp.28), por Hernández (2001), Universidad Católica de Valparaíso.

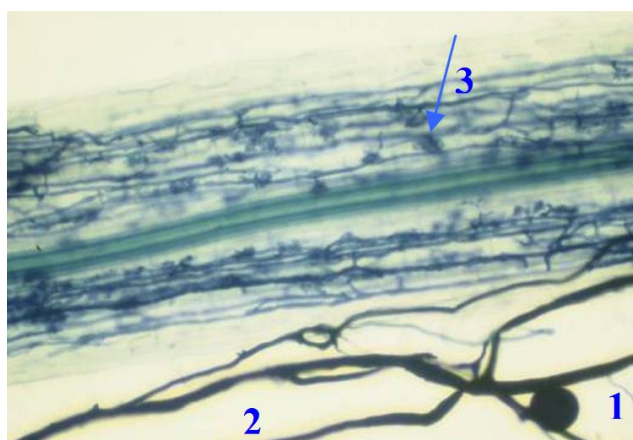
Las características que lo diferencian en este grupo se basan en la morfología de las esporas, *Glomus intraradices* forma esporas redondeadas (entre 40 y 190 μm de diámetro) en el interior de la célula hospedadora (Schenck & Pérez, 1998). El grosor de la pared varía entre 3 y 15 μm y se extiende hasta el pedúnculo de la espora en forma de tubo. El color de la espora puede variar desde amarillo a marrón claro (Nogales Garcia, 2006).

El proceso de colonización por el hongo MA comienza por la germinación de las esporas del hongo. A continuación, se forman apresorios por donde penetra la hifa a la superficie radical y coloniza el espacio intercelular del córtex de la raíz. Se activan enzimas degradadoras de pared celular no agresivas en el hongo, y tanto las células de las raíces como las del hongo cambian su patrón de expresión génica y su morfología. La hifa penetra a través de las paredes celulares y dentro de las células del córtex desarrolla estructuras de tipo arbuscular, denominadas

arbúsculos, formadas mediante repetidas ramificaciones dicótomas. Los arbúsculos, invaginaciones de la membrana donde tiene lugar el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo (Figura 3), son la estructura clave de la micorriza arbuscular (Nogales Garcia, 2006).

Figura 3

Raíz colonizada por Glomus intraradices



Nota. La figura 3 representa la raíz colonizada por *Glomus intraradices*, espora (1), micelio extraradical (2), arbúsculo (3). Tomado de: Estudio de la interacción entre el hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices* Schenck y Smith y el hongo patógeno *Armillaria mellea* (Vahl:fr) p. Kuhn en vid Fuente, (pp. 15), por Nogales García (2006), IRTA.

Importancia y beneficios de las micorrizas

Augé (2001), ratifica que son muchos los efectos beneficiosos de la simbiosis micorrícica. Se sabe que las micorrizas aportan a la planta fosfatos y otros nutrientes, y tienen un efecto positivo en su estado hídrico, en especial en plantas que están sometidas a estrés.

Otro efecto beneficioso importante es que las plantas colonizadas por hongos MA presentan un grado significativo de bioprotección frente a patógenos (Elsen et al., 2001). Nogales Garcia (2006), manifiesta que en la mayoría de información publicada acerca de este efecto protector de las asociaciones micorrícicas está limitada a su efecto en patógenos de raíz

y que la protección frente a este tipo de patógenos es consecuencia de varios mecanismos que probablemente interactúan entre ellos, como el incremento de vigor de la planta, la compensación de daños, la competencia directa con los microorganismos patógenos por el mismo espacio en la raíz, la producción de cambios en el sistema radical y en la micorrizosfera, la activación de mecanismos de defensa de la planta o la protección frente a estrés abióticos.

Las micorrizas arbusculares transportan varios elementos desde el suelo hasta la planta hospedadora, la simbiosis mejora la captación de fósforo, calcio, cobre, azufre, zinc y hierro, y esto es especialmente importante en el caso de los elementos inmóviles como fósforo, zinc y cobre, ya que su disponibilidad para la planta es limitada. A su vez, la mejora de la nutrición fosforada induce el crecimiento radical, aumenta la capacidad de absorción de agua y de nutrientes del sistema radical y afecta a procesos celulares en raíces (Nogales Garcia, 2006).

Las micorrizas arbusculares estimulan el crecimiento, desarrollo y nutrición de las plantas, especialmente en suelos de baja y moderada fertilidad los estudios llevados a cabo exponen que la micorriza mejora sustancialmente la absorción de nutrientes y agua por la planta, y que el principal nutriente es el fósforo (León, 2006). Por otra parte, el hongo se ve favorecido al obtener de 10 a 20% de compuestos de carbono, proveniente de la actividad fotosintética neta realizada por la planta (Salgado-Barreiro et al., 2012).

Sustratos para plantas

Generalidades de los sustratos para plantas

Hidalgo Loggiodice et. al (2009) considera que como sustrato debemos entender todo material o combinación de diferentes componentes que, no siendo tóxico, provea sostén, adecuada capacidad de intercambio catiónico, así como una adecuada retención de humedad para la planta que en éste crecerá, pero con una porosidad que garantice una correcta aireación

para un óptimo desarrollo radical. Por otro lado, es cualquier material individual, mezclado en proporciones volumétricas con otros componentes, para alcanzar un nivel adecuado de aireación, retención de agua y nutrientes para el crecimiento de plantas (Fonteno et al., 2000).

La elección de uno u otro componente de sustrato está sujeta mayormente a su disponibilidad, facilidad de mezcla y costo en la región en donde se encuentre el vivero, además de la experiencia en su uso. Cuando se prepara la mezcla para plantas frutales pueden emplearse dos o más materiales, de manera de garantizar que el sustrato final posea los valores apropiados de espacio poroso, retención de humedad y nutrientes y densidad aparente (Hidalgo Loggiodice et al., 2009).

Tipos de sustratos para el género *Vaccinium*

Pindstrup (2018), han diseñado varios sustratos para arándano del género *Vaccinium* donde los principales componentes son turba, fibra de coco y perlita. Entre las características principales que proporcionan la mezcla de estos sustratos son:

- Un óptimo equilibrio entre las proporciones de turba de sphagnum y otros componentes. La mezcla permite un fácil control del pH, y aporta una óptima regulación de los nutrientes, que dará soporte en las primeras fases del crecimiento vegetativo y del desarrollo de la planta.
- Al contener coco y/o perlita proporciona una estructura más abierta y una excelente capacidad de drenaje.

Projar (2016) recomienda también un sustrato a base de turba rubia, cocopeat y perlita, una mezcla perfecta para un cultivo de éxito de arándano. Pelizza et al. (2011), utilizaron diferentes sustratos con 2000 mg L^{-1} de AIB, determinaron que el sustrato compuesto por Plantmax® y cáscara de arroz carbonizada fue donde se obtuvieron mejores resultados.

Las estacas de muchas especies enraízan con facilidad en una gran diversidad de medios, como suelo, arena, turba, vermiculita, piedra pómez, perlita, agregados de plástico sintéticos y corteza desmenuzada como aserrín o virutas de madera (Richards et al., 1964), pero en aquellas que lo hacen con dificultad, como las de la familia Ericaceae no se ha logrado estandarizar (Castrillón et al., 2008).

Para el enraizamiento de estacas de mortiño no se reporta el sustrato óptimo, en su hábitat natural las plantas de este fruto, tal como otras de esta familia crecen en suelos ácidos con niveles de pH 4,5-5,0 (Luby et al., 1991). Las plantas del género *Vaccinium* se caracterizan por la baja tolerancia a la salinidad y se reporta el crecimiento adecuado en suelos que contienen elevados cloruros y sulfatos. En la zona alta andina de Colombia, este fruto se encuentra frecuentemente bajo la sombra de robles (*Quercus* sp.) y se caracteriza por tener alta presencia de micorrizas en el suelo (Castrillón et al., 2008).

Capítulo III

Materiales y métodos

Ubicación de la investigación

El presente proyecto de investigación se desarrolló en dos fases, una primera denominada Fase de Campo, que tuvo como fin el manejo y preparación de las plantas madre. Esta primera fase se desarrolló en la parcela de mortiño en Pailones de la Hacienda “El Prado”. La segunda denominada de Laboratorio, tuvo como fin la implementación del protocolo de aclimatación en las plantas in vitro de mortiño a través del uso de sustratos y micorrizas. Esta fase se desarrolló en las instalaciones del laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, IASA 1.

Ubicación política

La investigación se realizará en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando, en la Hacienda “El Prado” perteneciente a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA-ESPE, Laboratorio de Agrobiotecnología y parcela de mortiño en Pailones.

Ubicación geográfica

Las coordenadas geográficas y condiciones climáticas de la parcela de mortiño en Pailones son:

- Latitud: 0°25'13''S
- Longitud: 78°24'50''W
- Altitud: 2900 msnm
- Temperatura media anual: 14 °C
- Precipitación media anual: 1285 mm
- Humedad relativa: 69,03%

- Piso altitudinal: montano bajo

Figura 4

Ubicación de la parcela de mortiño en Pailones de la Hacienda El Prado



Nota. La figura 4 muestra la zona de Pailones, tomado de: Google Earth, Digital Globe, 2018.

Las coordenadas geográficas y condiciones climáticas del Laboratorio de Agrobiotecnología son:

- Latitud: 0°23'20''S
- Longitud: 78°24'44''W
- Altitud: 2737 msnm
- Temperatura media anual: 14 °C
- Precipitación media anual: 1285 mm
- Humedad relativa: 69,03%
- Piso altitudinal: montano bajo

Figura 5

Ubicación del Laboratorio de Agrobiotecnología de la Hacienda El Prado



Nota. La figura 5 muestra con una cruz azul el Laboratorio de Agrobiotecnología-IASA, tomado de: Google Earth, Digital Globe, 2019.

Métodos**Manejo de plantas madre de *Vaccinium floribundum* Kunth**

Se realizó un manejo continuo en las plantas de mortiño situadas en la parcela de Pailones, estas plantas fueron trasplantadas por Cerón (2019) el 02 de mayo de 2018 y tienen su origen en la provincia del Carchi, las cuales formaron parte de su investigación.

Se contó el número total de las plantas presentes, a la fecha actual existen 65 plantas de las 72 trasplantadas al inicio de la investigación ya mencionada. Al cultivo se lo mantuvo en constante cuidado y seguimiento. Entre las labores que se realizaron, fue el deshierbe, el cual se llevó a cabo por dos ocasiones cada 20 días, esta práctica evita que estas malezas extraigan nutrientes del suelo y también ayuda a disminuir la presencia de patógenos. Además, se realizó la aplicación de glifosato en sus alrededores para eliminar la maleza.

Se realizaron tres aspersiones en el cultivo de mortiño, antes de extraer el material, con el fin de reducir los microorganismos superficiales (endógenos) principalmente hongos, con el

objetivo de disminuir la contaminación in vitro como sugieren Rache-Cardenal & Pacheco-Maldonado (2010). La primera aspersión (Fig.6) se llevó a cabo el día domingo 24 de mayo del 2020, a primeras horas de la mañana con una dosis de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de Captan®, a los 8 días se aplicó un insecticida al constatar la presencia de *Spodoptera Frugiperda* en el cultivo, con una dosis de 4 ml.L^{-1} de Deltaclor®, y para finalizar se realizó la aspersión con 4 g.L^{-1} de Benomilo® el día jueves 25 de junio (ocho días antes de la toma del material) recomendado por Rache-Cardenal & Pacheco-Maldonado (2010) donde menciona que la solución con Benlate® fue efectivo para eliminar la mayor parte de hongos superficiales de los explantes primarios.

Para que las plantas madre se encuentren en buen estado nutricional, se realizaron dos fertilizaciones foliares con una dosis de 5 g.L^{-1} de Agrofol-Q® (30-10-10) el 1 y 25 de junio del 2020.

Figura 6

Aspersión de fungicidas y fertilizantes de plantas madre de Vaccinium floribundum Kunth



Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo consistió en la mitad de las sales minerales de Woody Plant Medium (PhytoTechLab) modificado sin nitrato de amonio, nitrato de calcio y sulfato de potasio el cual se

disolvió 0,27g.L⁻¹ y la mitad de las sales minerales de Murashige y Skoog (PhytoTechLab) 2.17 g.L⁻¹ (Tabla 3), de acuerdo con Trujillo (2008). El medio de cultivo, fue suplementado con constituyentes orgánicos como Mio-inositol (100 mg.L⁻¹), glicina (2 mg.L⁻¹), ácido nicotínico (0,5 mg.L⁻¹) y Thiamina HCl (0,1 mg.L⁻¹), sacarosa (30 g.L⁻¹), carbón activado (0,05 g.L⁻¹) (Castro-Restrepo & Álvarez-Guzmán, 2013), se solidificó con agar agar (10 g.L⁻¹), y se esterilizó en la autoclave a 121°C y 15 PSI, el pH se ajustó previamente a 5,4 con NaOH (Ostrolucká et al., 2004), se colocó zeatina (ZEA) 4 mg.L⁻¹, para la brotación (Reed & Abdelnour-Esquivel, 1991).

Para evitar contaminación fúngica se aplicó Carbendazim® en el medio de cultivo a dosis de 0,05 g.L⁻¹ de producto (Castro-Restrepo & Álvarez-Guzmán, 2013). Finalmente se dispensó el medio en una cantidad de 20 ml por frasco de vidrio estéril de 250 ml (Fig. 7), sellados con papel aluminio y plástico film.

Figura 7

*Elaboración de medio de cultivo para *Vaccinium floribundum* Kunth*



Nota. La Figura 7 muestra el proceso de preparación y dispensación de medio de cultivo en frascos esterilizados.

Tabla 3

Medios utilizados en la investigación: Woody Plant Modificado de Lloyd & McCown y Murashige & Skoog

Componente	½ WPM (mg.L⁻¹)	½ MS (mg.L⁻¹)	Medio final (mg.L⁻¹)
Nitrato de amonio	0	825	825
Ácido bórico	3,1	3,1	6,2
Cloruro de calcio, anhidrido	36,25	166,1	202,35
Cloruro de cobalto•6H ₂ O	0	0,0125	0,0125
Sulfato cúprico•5H ₂ O	0,125	0,0125	0,1375
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	18,65	18,63	37,28
Sulfato ferroso•7H ₂ O	13,93	13,9	27,825
Sulfato de magnesio•H ₂ O	11,15	8,45	19,6
Sulfato de magnesio, anhidrido	90,35	90,35	180,7
Ácido molíbdico (sal de sodio)•2H ₂ O	0,125	0,125	0,25
Yoduro de potasio	0	0,41	0,41
Nitrato de potasio	0	950	950
Fosfato de potasio, monobásico	85	85	170
Sulfato de zinc•7H ₂ O	4,3	4,3	8,6

Nota. Adaptado de: L444 Lloyd & McCown Woody Plant Modified Basal Salt Mixture y M524

Murashige & Skoog (MS) Basal Salt Mixture, (pp.1), por PhytoTechLab (2020).

Suplementado con: Mio-inositol (100 mg.L⁻¹), glicina (2 mg.L⁻¹), ácido nicotínico (0,5 mg.L⁻¹), Tiamina HCl (0,1 mg.L⁻¹), sacarosa (30 g.L⁻¹), carbón activado (0,05 g.L⁻¹), ZEA (4 mg.L⁻¹), agar agar (10 g.L⁻¹), ajustado a pH 5,7.

Recolección y desinfección del material vegetal

Se seleccionaron plantas madre que reunieran las siguientes características: libres de enfermedad, vigor vegetativo, producción de flores y frutos, constante producción de ramas vegetativas y florales (Castillo, 2004). De las 65 plantas donadoras se escogieron diez (Tabla 16), de las cuales se tomó el material vegetativo juvenil.

Se recolectaron un total de 26 estacas de 15 cm a primeras horas de la mañana, que se colocaron en fundas estériles de papel con agua destilada para evitar su oxidación. En el laboratorio se procedió rápidamente a cortar las hojas, dejando una parte del pedicelo para evitar la oxidación de la yema, posteriormente se las lavaron con ayuda de un cepillo en una solución con agua y jabón Protex[®], finalmente se cortó en segmentos de 8 a 10 cm y se dejó reposar por 30 minutos al agregar 8 gotas.L⁻¹ de Povidyn[®], con el fin de eliminar microorganismos superficiales (Olmos et al., 2016).

Al pasar 30 minutos se realizó un lavado con agua destilada y se sumergieron en etanol (70%) por un minuto. En cámara se procedió a trasladar los explantes a Hipoclorito de sodio (1%) durante 5 minutos, y posteriormente, en nitrato de plata 0,5% (p/v) por 5 minutos, finalmente se efectuaron tres lavados con agua destilada estéril y se dejó secar en papel estéril (Castro-Restrepo & Álvarez-Guzmán, 2013).

Figura 8*Recolección y desinfección del material vegetal de mortiño*

Nota. La Figura muestra el corte de material vegetal de plantas madre de *Vaccinium floribundum* Kunth en la parcela de la Hacienda “El Prado”.

Introducción del cultivo in vitro

Para la siembra (Fig.9), se colocaron 3 explantes en cada frasco de aproximadamente 4 a 5 cm, en 25 frascos, dando un total 75 explantes, de los cuales se retiró con anterioridad todo el pedicelo en condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar con ayuda de una tijera y pinza estériles, se los sello con aluminio en doble capa.

Los cultivos se incubaron a 21 °C con un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad (6:30 am. -18:30 pm.), como fuente de luz se utilizaron focos fluorescentes (20 Watts), estos permanecieron en las condiciones ya mencionadas por 42 días, se fue retirando los explantes que presentaron contaminación (Castro-Restrepo & Álvarez-Guzmán, 2013).

Figura 9

Introducción del cultivo de mortiño in vitro



Nota. La Figura muestra el proceso de siembra de explantes de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

El porcentaje de contaminación se evaluó en el número de explantes afectados por microorganismos los cuales fueron medidos hasta que culmine la fase de introducción, aplicando la siguiente fórmula:

Fórmula 1

Fórmula para calcular el Porcentaje de contaminación in vitro

$$\%Contaminación\ in\ vitro = \frac{\#explantes\ contaminados}{\#total\ de\ explantes} \times 100$$

Además, se observó al microscopio los agentes causales de la contaminación (hongo).

La evaluación de la oxidación fenólica se realizó de manera visual después de la siembra de las microestacas hasta las 6 semanas. Se consideró existencia de oxidación a los explantes con ponderación baja, media y alta según Domínguez et al. (2016).

- Baja: <33% (Presencia de fenoles, obscurecimiento en los extremos de la microestaca).
- Media: 66% (Liberación de fenoles con presencia en microestacas y en el medio de cultivo).

- Alta: 99% (Microestaca totalmente necrosada).

Aplicando la siguiente fórmula:

Fórmula 2

Fórmula para calcular el porcentaje de oxidación fenólica in vitro

$$\%Oxidación\ in\ vitro = \frac{\#explantes\ oxidados}{\#total\ de\ explantes} \times 100$$

Los datos de supervivencia se obtuvieron a los 42 días (6 semanas) de la siembra del cultivo de *Vaccinium floribundum* Kunth en el medio WPM/MS con 4 mg/L de zeatina. Para lo cual se realizó la siguiente operación:

Fórmula 3

Fórmula para calcular el porcentaje de supervivencia in vitro

$$\%Supervivencia\ in\ vitro = \frac{(Ex.\ sembrados - Ex.\ contaminados - Ex.\ oxidados) \times 100}{Ex.\ sembrados}$$

Preparación de mezcla de sustratos

Se esterilizaron los sustratos cascarilla de arroz, tierra negra, fibra de coco, turba rubia y pomina en recipientes de aluminio con un espesor de 1 cm por una hora y 30 minutos a 82 °C en la estufa por medio de calor seco (Trujillo, 2008). Posteriormente se mezcló los sustratos en condiciones de asepsia, según los tratamientos establecidos; se colocó la mezcla S1 (40% Cascarilla de arroz, 40% tierra negra y 20% pomina) en una cantidad de 22 gramos y S2 (50% Turba rubia, 30% Fibra de coco y 20% pomina) en una cantidad de 45 gramos aproximadamente en frascos plásticos desinfectados con etanol 70° y esterilizados en cámara UV durante 2 horas. Se midió previamente el pH de los sustratos ya mezclados, de manera que resultaron ser adecuados para el cultivo de mortiño S1: 5,57 y S2: 5,69.

Se aplicó 5 ml de agua destilada estéril (ADE) en cada frasco con sus sustratos y se dejó reposar por 30 minutos para luego aplicar las dosis de micorrizas por tratamiento ya asignadas (75g.L^{-1} y 100g.L^{-1}) en una cantidad de 10 ml (Fig.10).

Figura 10

Preparación de tratamientos



Nota. La Figura 10 muestra el proceso de pesaje y aplicación de las dosis de micorrizas en los sustratos.

Enraizamiento ex vitro y aclimatación

Se procedió al trasplante de 48 plántulas in vitro de 42 días, se eligieron plántulas sanas y con un mínimo de 3 hojas.brote⁻¹. Se extrajo a cada una del medio de cultivo, se las sumergió en agua destilada estéril para retirar los residuos y posterior a ello se dejó reposar por 5 minutos en una solución de 1g.L^{-1} de Benomilo®, para evitar contaminación fúngica; finalmente se realizó un lavado en agua destilada estéril y se secó en papel esterilizado previamente con calor seco (Gil Rivero et al., 2017).

Antes del trasplante se sumergió a cada plántula en una solución de 2000mg.L^{-1} de IBA por 15 segundos de acuerdo a lo recomendado por Castro-Restrepo & Álvarez-Guzmán (2013), después se selló con otro vaso en la parte superior con plástico film, para tener las condiciones

de microinvernadero (cámara húmeda) (Fig.11), semejante a la aclimatación de Valencia-Juárez et al. (2019) y Gil-Rivero et al. (2017).

Se regó por aspersion con agua estéril dos veces por semana hasta finalizar la investigación, a los 8 días se procedió a realizar una perforación con ayuda de un bisturí caliente y desinfectado con alcohol en el vaso superior según se señala en la Tabla 4, hasta el día 28 que se retira finalmente. La luz se fue incrementada a partir del cuarto día, desde dos hasta 12 horas al día 28, por lo cual se utilizaron dos focos fluorescentes (luz) y uno incandescente (calor), manteniendo una temperatura promedio al finalizar de 22°C.

Tabla 4

Proceso de aclimatación para Vaccinium floribundum Kunth en cámara húmeda

Día	Número de perforaciones	Horas luz
1	0	0
4	0	2
8	1	4
12	2	6
16	3	8
20	4	10
24	5	12

Nota. Después del día 28 se retira la parte superior y las horas luz se mantienen (12 horas), hasta los 45 días para transferir a campo.

Figura 11

Enraizamiento ex vitro y aclimatación



Nota. La Figura 11 muestra la cámara húmeda con los explantes de mortiño trasplantados.

Para el porcentaje de supervivencia, los datos se obtuvieron a los 45 días del trasplante de las plántulas obtenidas del cultivo de *Vaccinium floribundum* Kunth en el medio WPM/MS con 4 mg.L⁻¹ de zeatina. Para lo cual se realizó las siguientes operaciones por tratamiento:

Fórmula 4

Fórmula para calcular el porcentaje de supervivencia en la etapa de aclimatación

$$\%Supervivencia\ aclimatación = \frac{Plantas\ vivas \times 100}{Plantas\ trasplantadas}$$

Mientras tanto para el tiempo de supervivencia, los datos se evaluaron hasta los 45 días del trasplante de las plántulas.

Se observó a la vez la presencia de contaminación en los tratamientos hasta los 45 días evaluados, para lo cual se aplicó la siguiente fórmula:

Fórmula 5

Fórmula para calcular el porcentaje de contaminación en la etapa de aclimatación

$$\%Contaminación\ aclimatación = \frac{Plántulas\ contaminadas}{Total\ de\ plántulas} \times 100$$

Además, se observó al microscopio los agentes causales de la contaminación (hongo).

Diseño experimental

Factores

- Tipo de sustrato

Niveles:

S1: 40% Cascarilla de arroz + 40% Tierra negra + 20% Pomina

S2: 50% Turba rubia + 30% Fibra de coco + 20% Pomina

- Dosis de micorrizas Humipower

Niveles:

D1: 75 g.L⁻¹ de micorrizas Humipower

D2: 100 g.L⁻¹ de micorrizas Humipower

Tratamientos

Los tratamientos probados en el ensayo de la fase de enraizamiento y aclimatación de las plántulas obtenidas in vitro de *Vaccinium floribundum* Kunth, se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 5

Descripción de tratamientos usados en la investigación

Tratamiento	Sustrato y dosis de micorrizas en fase de enraizamiento y aclimatación
T1	40% Cascarilla de arroz + 40% Tierra negra + 20% Pomina y 75 g.L ⁻¹ de micorrizas Humipower
T2	40% Cascarilla de arroz + 40% Tierra negra + 20% Pomina y 100 g.L ⁻¹ de micorrizas Humipower
T3	50% Turba rubia + 30% Fibra de coco + 20% Pomina y 75 g.L ⁻¹ de micorrizas Humipower
T4	50% Turba rubia + 30% Fibra de coco + 20% Pomina y 100 g.L ⁻¹ de micorrizas Humipower

Tipo de diseño

El ensayo sigue una estructura de parcelas con una distribución completamente al azar y una estructura de tratamientos de tipo factorial 2x2, cada tratamiento consta de 12 repeticiones.

Características de las unidades experimentales

Se instalaron 48 unidades experimentales (UE), formadas de una plántula cada una, donde estuvieron dispuestas en los diferentes sustratos e incorporados las dosis de micorrizas ya establecidas en el diseño experimental. Cada tratamiento está conformado por 12 repeticiones.

Croquis del diseño experimental

T1R10	T3R3	T2R2	T2R4	T1R3	T4R3	T3R7	T2R6	T1R9	T3R8	T1R11	T4R6
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T3R4	T1R2	T4R2	T3R2	T1R5	T3R11	T4R4	T3R10	T2R5	T1R1	T2R7	T2R9
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
T2R10	T4R10	T2R3	T1R4	T2R11	T3R12	T3R6	T1R8	T1R12	T2R1	T4R7	T4R11
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
T2R12	T4R5	T4R9	T3R9	T1R6	T2R8	T4R1	T3R5	T1R7	T4R8	T3R1	T4R12
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48

Análisis estadístico y funcional

Para el análisis de datos se utilizó el programa estadístico Infostat, mediante un análisis de varianza de la variable medida y prueba de Duncan $p \geq 0.005$ para la separación de medias, previo al análisis se verificaron los supuestos de ANOVA: normalidad de datos y la homogeneidad de varianza.

Tabla 6

Análisis de varianza para un DCA factorial 2x2 con 12 repeticiones

Fuentes de variación	Grados de libertad
Sustrato, S	1
Dosis de micorriza, D	1
SxD	1
Error experimental	44
Total	47

El modelo estadístico será:

$$y_{ijk} = \mu + S_i + D_j + SD_{ij} + E_{ij}$$

Donde,

y_{ijk} = Tiempo de supervivencia de plántulas

μ = media general

S_i = efecto del i-ésimo sustrato

D_j = efecto del i-ésima dosis de micorriza

SD_{ij} = efecto del i-ésima interacción Sustrato x Dosis de micorriza.

E_{ij} = error experimental

Capítulo IV

Resultados y discusión

Evaluación del porcentaje de contaminación y oxidación fenólica in vitro

Con el cálculo del porcentaje de contaminación (Fórmula 1) y el porcentaje de oxidación fenólica (Fórmula 2) se obtuvo un 8% y un 13,33% respectivamente a los 42 días en la fase de introducción en el medio $\frac{1}{2}$ MS y $\frac{1}{2}$ WPM modificado con $4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zeatina (Tabla 7).

Durante la etapa de 6 semanas se evidenció la mayor cantidad de explantes oxidados y contaminados a la semana 2 entre el día 8 y 14, a medida que transcurrió el tiempo estos porcentajes se redujeron progresivamente (Fig. 13).

Tabla 7

Variables, número y porcentajes de explantes evaluados en la fase in vitro de mortifio durante 6 semanas

Variables	N° de explantes	% de explantes
Contaminación	6	8
Oxidación fenólica	8	13,33
Brotación	48	64
Supervivencia	59	78,67

Nota. La Tabla 7 muestra datos evaluados en un total de 75 explantes de mortifio.

Figura 12

Contaminación y oxidación fenólica de explantes de mortiño en etapa in vitro de 6 semanas.

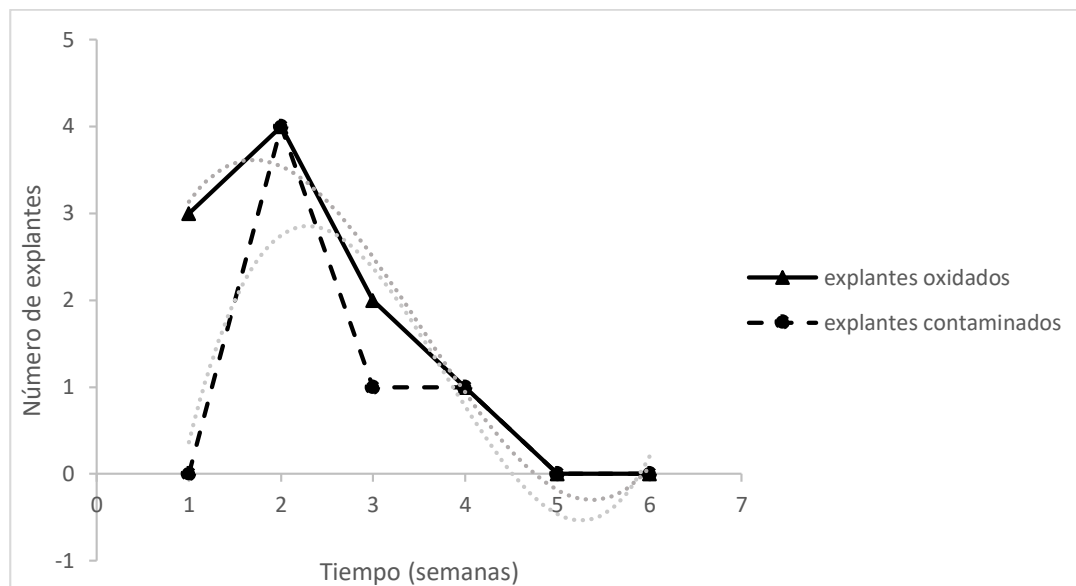
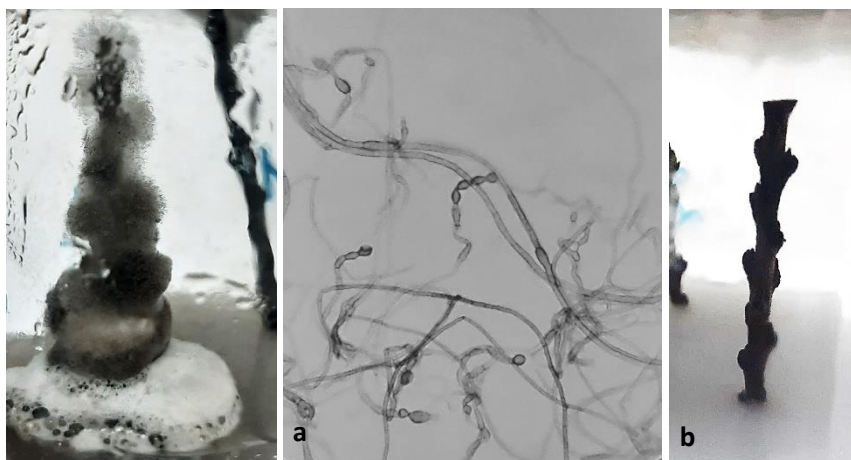


Figura 13

Explantes in vitro de Vaccinium floribundum Kunth



Nota. La figura muestra: a) explante contaminado, b) micelio de *Cladosporium* visto al microscopio 40X y c) explante fenolizado. (Identificado por César Falconi).

A diferencia de estudios realizados en *V. floribundum* que presentaron los siguientes porcentajes de contaminación: 40% (Trujillo, 2008), 30% (Dueñas Mendoza, 2017) y 100%

(Chamorro, 2019); y blueberry un 40% (Tetsumura et al., 2008), deduciendo que el protocolo de desinfección utilizado en sus ensayos no permitió erradicar eficazmente la contaminación de los tallos introducidos in vitro. La causa principal de contaminación fueron hongos que resistieron a la desinfección, debido a que los explantes provenían de plantas silvestres que no tuvieron un manejo adecuado antes de su recolección.

Jaakola et al. (2001), confirman que la introducción in vitro de explantes de *Vaccinium* es muy limitada cuando se utilizan plantas de campo y, según Brisette, Tremblay & Lord (1990) se debe al alto grado de contaminación de las plantas cuando crecen en su hábitat natural. Sin embargo, Hine-Gómez & Abdelnour-Esquivel (2013) obtuvieron 25 % de contaminación entre el día 9 y 18 en *Vaccinium corymbosum*, aun realizando un manejo fitosanitario de las plantas madre previo a la colecta.

Los resultados de los ensayos anteriores difieren a la presente investigación, la cual obtuvo un 8% de contaminación, lo que demuestra que el buen manejo cultural y sanitario de las plantas madre con aplicaciones de fungicidas, control de malezas y una adecuada nutrición antes de la colecta, es fundamental para que los explantes sigan en el proceso de micropropagación. Además, el protocolo de desinfección previo a la introducción fue efectivo, al igual que el uso de Carbendazim® a bajas dosis ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$) en el medio de cultivo redujo la formación de hongos de manera significativa, como propone Castro-Restrepo & Álvarez-Guzmán (2013) en su estudio de *Vaccinium meridionale* que disminuyó la presencia de hongos entre el 2 y 5%.

Respecto al porcentaje de oxidación fenólica, este fue cuantificado en un 13,33%, el cual concuerda con Rache-Cardenal & Pacheco-Maldonado (2010) que presentó porcentajes entre 10 y 20% al utilizar $\frac{1}{2}$ MS en el estudio de *Vaccinium meridionale*; también resulta ser óptimo en

comparación a Dueñas Mendoza (2017) que reportó un 40% de oxidación en *Vaccinium floribundum*, mencionando que la plantas leñosas son más propensas al estrés oxidativo.

Uno de los factores que reducen la oxidación es el manejo de plantas madres mediante podas y fertilización adecuada para obtener material juvenil. También es fundamental en la recolección evitar cortes de material vegetativo de tamaño menor a 20 cm como lo describe Vaca y Landázuri (2013) en estudios de mora de castilla, ya que evita el proceso de fenolización y oxidación desde el campo, es importante que el tiempo transcurrido desde la recolección hasta el momento de la siembra sea el menor posible.

Cabe mencionar que agregar carbón activado en una dosis de 0,05 g.L⁻¹ en el medio de cultivo ayudo en la absorción de fenoles, reduciendo la oxidación de los explantes en la fase de introducción en el cultivo in vitro de mortiño como describe Castro-Restrepo & Álvarez-Guzmán (2013) en su estudio de *V. meridionale*.

Evaluación del porcentaje de supervivencia, brotación y tamaño de brotes en la fase in vitro.

Los datos del porcentaje (Fórmula 3) de supervivencia y brotación se registraron a los 42 días (6 semanas) de la siembra del cultivo de *Vaccinium floribundum* Kunth en el medio ½ WPM y ½ MS con 4 mg.L⁻¹ de zeatina, el cual se cuantificó en un 78,67% de supervivencia y 64 % de brotación (Tabla 7). Se registró un promedio de 1,75 brotes.explante⁻¹, un tamaño de 0,44 cm brote y 8,08 hojas.brote⁻¹ (Tabla 13).

Figura 14

Explantos de mortiño in vitro



Nota. La figura 19 muestra un explante in vitro de mortiño, 42 días después de la siembra.

El porcentaje de brotación (64%) y número de hojas.brote⁻¹ (8,08) obtenido en la presente investigación difiere con Dueñas Mendoza (2017) que obtuvo un 30% de brotes viables con 2 a 4 hojas. brote⁻¹ a los 30 días en medio WPM sin hormonas. En comparación con Trujillo (2008) el tamaño de brote 2 a 6 mm es similar al utilizar Trans zeatina ribósido (1mg.L⁻¹) y Ácido naftalenacético (0,1mg.L⁻¹) en medio WPM modificado con un pH de 5,2. A su vez resulta ser aceptable el número de brotes.explante⁻¹ (1,75) a diferencia de Rache-Cardenal & Pacheco-Maldonado (2010), que cuantificó 1,4 brotes.explante⁻¹ en medio MS/3 con 6-Bencilaminopurina (0,1mg.L⁻¹) y Ácido indol-3-acético (1,7 mg.L⁻¹) con un pH de 5,0 en la especie *Vaccinium meridionale*.

Los resultados de la presente investigación demuestran que la hormona zeatina en una dosis de 4 mg.L⁻¹ fue adecuada para propagar explantes in vitro de *V. floribundum*, Debnath (2006) ratifica que la dosis de 0.2 mg. L⁻¹ a 4.4 mg.L⁻¹ de zeatina es utilizada en varios protocolos ya establecidos, además Debnath (2004) evaluó que la rapidez de multiplicación y la altura de brotes aumentaban con su concentración en lowbush blueberry. Al igual Meiners et al. (2007)

confirmó que la hormona zeatina en el medio de cultivo fue eficaz para arándano rojo (Red Pearl y Ozarkblue). Gonzales et al. (2000) en cambio, encontraron que no se dio elongación, pero sí una buena propagación en medios con zeatina.

Referente al pH del medio utilizado, Ostrolucká et al. (2004) mencionan que puede influir en la formación de brotes y raíces en algunas plantas. Las plantas del género *Vaccinium* son acidófilas y con el cultivar 'Duke' se confirmó que la intensidad de proliferación de brotes aumentó a un pH 4,0 a 5,5 en el medio de cultivo. Por lo cual se deduce que los resultados obtenidos estuvieron influenciados por el pH de 5,4 usado en la investigación, proporcionando una cantidad de brotes adecuada.

Finalmente se debe tener en cuenta el medio de cultivo utilizado ($\frac{1}{2}$ WPMm + $\frac{1}{2}$ MS) recomendado por Trujillo (2008), incidió en la alta supervivencia del ensayo. En concordancia al estudio realizado de Rache-Cardenal & Pacheco-Maldonado (2010) que cuantificó los porcentajes más altos de supervivencia de 70% en el medio WPM y AND suplementados con 2-IP más AIA durante 45 días de cultivo de *Vaccinium meridionale*.

Evaluación del porcentaje de supervivencia y contaminación en la fase de aclimatación

Los datos de la supervivencia y contaminación se registraron a los 45 días del trasplante de las plántulas obtenidas del cultivo in vitro de *Vaccinium floribundum* Kunth, se calculó el porcentaje de las variables por tratamiento (Fórmula 4 y 5), se cuantificó la mayor supervivencia y menor contaminación en el Tratamiento 4 con un 66,67% y 8,33% respectivamente. Se confirmó que el hongo que produjo la contaminación fue el mismo de la fase in vitro, lo que pudo ocurrir debido a que el hongo se encontraba en estado latente dentro del explante hasta el momento del trasplante, donde se presentaron las condiciones ambientales óptimas para su desarrollo.

Tabla 8

Porcentaje de supervivencia y contaminación por tratamientos

Tratamiento	Sustrato	Dosis	% Supervivencia	% Contaminación
1	S1	D1	25	33,33
2	S1	D2	25	25
3	S2	D1	50	16,67
4	S2	D2	66,67	8,33

Nota. S1: Cascarilla de Arroz, tierra negra y pomina (40%-40%-20%), S2: Turba, fibra de coco y pomina (50%-30%-20%), D1: 75 mg. L⁻¹ de micorrizas Humipower, D2: 100 mg. L⁻¹ de micorrizas Humipower.

Figura 15

Porcentaje de supervivencia y contaminación por tratamiento

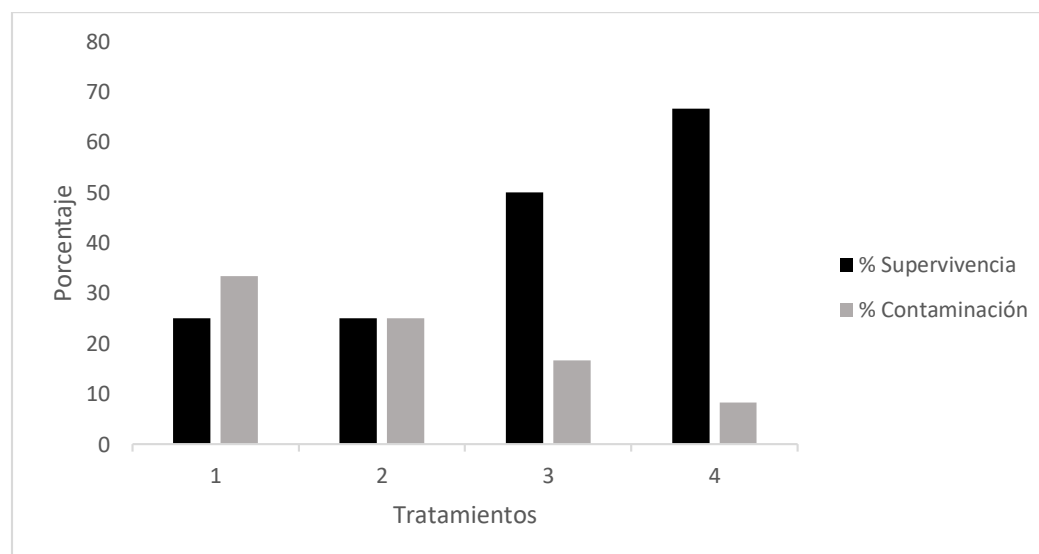


Figura 16

Plántula de mortiño contaminada con Cladosporium en sustrato dos



Evaluación del tiempo de supervivencia en la fase de aclimatación

En el análisis de varianza no se mostró una interacción significativa entre los sustratos y las dosis de micorrizas sobre el tiempo de supervivencia de las plántulas de mortiño (*Vaccinium floribundum*) en la fase de aclimatación ($F_{1,44}=1,27$; $p=0,2657$). Sin embargo, en los sustratos evaluados si se encontraron diferencias significativas ($F_{1,44}=11,03$; $p=0,0018$). Por consiguiente, se presentó un mayor tiempo de supervivencia en las plántulas de mortiño trasplantadas en el sustrato 2 (50% Turba rubia + 30% Fibra de coco + 20% Pomina) (Tabla 10). Teniendo en cuenta que la dosis de micorrizas sobre la variable de respuesta no fue significativa ($F_{1,44}=0,04$; $p=0,8418$).

Tabla 9

Nivel de significancia del tiempo de supervivencia de las plántulas de mortiño a los 45 días después del trasplante en dos sustratos y dos dosis de micorrizas

Tiempo de supervivencia (días)	
Sustrato (S)	*
Dosis de Micorriza (D)	NS
SxD	NS

Nota. NS, No significativo; *, significativo a $p \leq 0.05$.

Tabla 10

*Promedio \pm error estándar del tiempo de supervivencia a los 45 días después del trasplante, en la aclimatación de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt)*

Tiempo de supervivencia (días)	
S1	30,83 \pm 2,21 a
S2	39,79 \pm 1,51 b

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

Figura 17

Plántulas de mortiño a los 45 días después del trasplante



Nota. La figura 22 muestra plantas de mortiño en sustrato 2 (50% turba rubia + 30% fibra de coco + 20% pomina) con dosis de micorrizas Humipower a) 75 mg.L^{-1} y b) 100 mg.L^{-1} .

Según los resultados obtenidos a los 45 días en la etapa de aclimatación la supervivencia se cuantificó en 66,67% y contaminación en 8% en el tratamiento 4, los cuales son eficientes en comparación a Trujillo (2008) que obtuvo una mortalidad de 100% al transcurrir 45 días, debido a que las plantas comenzaron morir al secarse o por contaminación en el sustrato. Cabe recalcar que las plántulas de dicho estudio fueron obtenidas de semillas, y probablemente las raíces eran delgadas y varias de ellas aéreas. Pospíšilová (1999) reporta que las plantas cultivadas in vitro tienen una mala conductividad hídrica en las raíces, por lo tanto, no existen conexiones adecuadas entre la raíz y el tallo.

En cambio Castro Fernandez (2015) reportó que 30 días después de la transferencia de medio de enraizamiento a sustrato en cámara húmeda tuvieron un porcentaje de supervivencia superior al 80% en brotes de *Vaccinium corymbosum*, pero 75 días después los niveles

decrecieron ya que los brotes pasaron al invernadero. De cualquier modo, se lograron supervivencias superiores al 40% en brotes procedentes de medio MS 1/3.

González et al. (2000) mencionó que se ha logrado enraizamiento y aclimatación de plantas en sustrato, por ello es necesario recalcar que se utilizó este principio en la presente investigación. En el género *Vaccinium* es común sumergir a la planta en IBA antes de la siembra al sustrato que generalmente está compuesto de turba, perlita o vermiculita y se las coloca de 1 a 4 meses en la cámara húmeda (Debnath & McRae, 2001). Trujillo (2008) indica que el proceso de aclimatación dura entre 2 semanas a 2 meses para varias especies de *Vaccinium*. La presente investigación tuvo un tiempo de aclimatación de 45 días, de los cuales 28 días permanecieron en cámara húmeda y los 17 días restantes continuaron con luz artificial, además Noé & Eccher (1994) argumentan que es común observar altos porcentajes de supervivencia si las plantas generan raíces, en esta investigación no se observó formación de raíces al aplicar IBA en dosis de 2000 mg.L⁻¹ recomendado por Castro-Restrepo & Álvarez-Guzmán (2013) en el estudio de *V. meridionale*.

Mientras tanto el mayor tiempo de supervivencia se registró de un promedio de 39,79 días, entre las causas principales de la muerte de las plantas de mortuño se atribuye a que no produjeron raíces o pelos absorbentes que permitan una absorción apropiada de nutrientes al resto de la planta y las hojas se iban secando al pasar el tiempo. Noé & Bonini (1996) señalan que las hojas al ser propagadas in vitro son más delicadas por su falta de estomas funcionales o insuficiente cera epicuticular, características que permiten una regulación eficiente de la transpiración, en consecuencia una pérdida de agua más rápida de la que se encuentran acostumbradas. El mal transporte y retención de agua de las hojas, puede ocasionar que éstas se sequen rápidamente (Pospíšilová, 1999).

Por lo tanto, para finalizar la fase de aclimatación en nuestro estudio, el porcentaje de supervivencia de las plántulas de mortiño a los 45 días resulta ser aceptable, al no encontrar información de un protocolo eficiente de enraizamiento y aclimatación ex vitro de explantes de la misma especie. Es importante destacar que las plantas de la presente investigación tuvieron mayor tiempo de supervivencia en el sustrato 2 compuesto por 50% Turba rubia + 30% Fibra de coco + 20% Pomina, con un pH 5,6. Similar a Meiners et al. (2007) que mencionan que los brotes de la especie *V. coymbosum*, fueron enraizados en bandejas con turba, arena y perlita (4: 2: 1) y pH 4,5–5. En la misma especie Ostrolucká et al.(2004) sugieren mantener los explantes de 5 a 6 semanas ex vitro, directamente en sustrato de turba. De igual forma Projar (2016) recomienda un sustrato a base de turba rubia, fibra de coco y perlita, el cual resulta ser una mezcla perfecta para un cultivo de arándano, además PINDSTRUP (2018) han diseñado varios sustratos para arándano donde los principales componentes son turba, fibra de coco y perlita.

Capítulo V

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

En la etapa de aclimatación, el factor dosis de micorrizas no ocasionó efecto en los explantes de mortiño debido a que no presentó significancia en el análisis estadístico ($F_{1,44}=0,04$; $p=0,8418$). Al contrario del factor tipos de sustratos que sí tuvo efecto significativo, al obtener el mayor tiempo de supervivencia con 39,79 días con el sustrato 2 (50% Turba rubia + 30% Fibra de coco + 20% Pomina), a comparación del sustrato 1 (40% Cascarilla de arroz + 40% Tierra negra + 20% Pomina) con 30,83 días.

En el proceso de introducción in vitro de mortiño, se obtuvo un 78,67% de supervivencia con el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS y $\frac{1}{2}$ WPM modificado + 4mg.L^{-1} de zeatina y un 66,67% de supervivencia en la fase de aclimatación con el tratamiento 4 (50% Turba rubia + 30% Fibra de coco + 20% Pomina y 100 g.L^{-1} de micorrizas Humipower) en el estudio de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).

Se desarrolló un protocolo eficiente en la introducción in vitro, al obtener un 8% de contaminación y 13.33% de oxidación, además de una supervivencia de 78.67% y brotación de 64% con los parámetros utilizados. De manera similar se estandarizó un protocolo aceptable en la etapa de aclimatación al obtener una supervivencia del 66.67% de las plantas de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) al finalizar la investigación.

Recomendaciones

Para evitar desarrollo de hongos y bacterias al momento de la aclimatación de mortiño, es aconsejable el uso de sustratos compuestos por una mezcla de 50% turba, 30% fibra de coco y 20% pomina, realizando una esterilización con calor seco a 82 °C en una fina capa de 1 cm.

Se recomienda un adecuado manejo sanitario de las plantas madre bajo invernadero para garantizar buenos resultados in vitro. Utilizar fungicidas específicos como Captan (1,5 g.L⁻¹) y Benomilo (4 g.L⁻¹), además para mejorar el estado nutricional usar fertilizantes foliares como Agrofol-Q® (5 g.L⁻¹).

En la etapa de introducción in vitro se recomienda utilizar material vegetativo joven y el protocolo de desinfección ya mencionado en la investigación, en vista de que se obtuvo un bajo porcentaje de contaminación y oxidación fenólica.

Con la finalidad de lograr un adecuado enraizamiento se recomienda prolongar la aclimatación a dos meses.

Bibliografía

Alhuja, M. (1992). *Micropropagation of Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.

DOI: 10.1007 / 978-94-015-8116-5

Ariza, A. (2018). *Avances en la propagación in vitro de agraz (Vaccinium meridionale Swartz)*.

[Tesis de máster: Universidad Nacional de Colombia].

Augé, R. (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis.

Mycorrhiza, 11, pp. 3-42. <https://doi.org/10.1007/s005720100097>.

Báez-Pérez, A., González-Molina, L., Solís Moya, E., Bautista-Cruz, A., y Bernal-Alarcón, M. d.

(2015). Efecto de la aplicación del ácido indol-3-butírico en la producción y calidad de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(3), pp. 523-537.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342015000300007&lng=es&tlng=es.

Brenes, A. C. (2014). *Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (Vaccinium spp.) a*

partir de segmentos foliares de dos procedencias. *Agronomía Costarricense*, 39(1), pp.

7-23. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/19541>

Brisette, L., Tremblay, L., y Lord, D. (1990). *Micropropagation of lowbush blueberry from mature*

field-grown plants. *Horticultural Science*, 25 (3), pp. 349-351. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.25.3.349>

HORTSCI.25.3.349

Cano, M. (2013). *Aplicación de la micropropagación y la crioconservación ex situ de especies*

vegetales de interés. [Tesis de doctorado en Administración Ambiental: Universidad de

Alicante]. https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/35678/1/Tesis_Cano_Castillo.pdf

- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA Las Brujas: Unidad de Biotecnología.
<http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>
- Castrillón, J. C., Carvajal, E., Ligarreto, G., y Magnitskiy, S. (2008). El efecto de auxinas sobre el enraizamiento de las estacas de agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*) en diferentes sustratos. *Agronomía colombiana*, 26(1), pp. 16-22. <https://www.redalyc.org/pdf/1803/180314729003.pdf>
- Castro Fernandez, A. M. (2015). Mejora de la propagación in vitro de *Vaccinium corymbosum* y evaluación de la actividad antioxidante en arándanos comerciales. [Tesis de master en Biología Molecular, Celular y Genética: Universidad da Coruña]. https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/17519/CastroFernandez_AnaMaria_TFM_2016.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Castro-Restrepo, D., y Álvarez-Guzmán, J. A. (2013). Micropropagación clonal de tres genotipos mortiño, *Vaccinium meridionale Sw.*, por proliferación de yemas axilares. *Actual Biol*, 35(99), pp. 135-144. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842013000200002&lng=en&tlng=es.
- Cerón, M. (2019). Caracterización agronómica y determinación del tiempo térmico en las etapas iniciales del mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*) para prospección de producción forzada en la hacienda El Prado IASA I - ESPE. [Tesis de grado en Ingeniería Agropecuaria: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/21020>

- Chamorro, G. (2019). "Determinación de métodos de propagación sexual y asexual del mortiño (*Vaccinium floribundum*) con fines de conservación de la especie". [Tesis de grado en Ingeniería en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo: Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <https://docplayer.es/170526593-Pontificia-universidad-catolica-del-ecuador-sede-ibarra.html>
- Coba, P. S., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M. F., Yugsi, E., y Huachi, L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja, Revista de Ciencias de la Vida*, 16(2), pp. 5-13. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476047400002>
- Correa, J., y Jácome, J. (2015). Evaluación de métodos de propagación de *Macleania rupestris* (Joyapa) mediante la germinación de semillas y micropropagación de meristemas. [Tesis de grado en Ingeniería Agrónoma: Universidad Distrital Francisco José de Caldas]. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/33379/1/trabajo%20de%20titulaci%C3%B3n.pdf>
- De Klerk, G. (1990). How to measure somaclonal variation . *Acta Botanica Neerlandica*, pp. 129-144. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1990.tb01481.x>
- Deberg, C., Coster, G., y Steubaut, W. (1993). Carbendazim as an alternative growth regulator in tissue culture systems. *In Vitro Cell Biology*, pp. 89-91. <https://www.researchgate.net/publication/262753948>
- Debnath, S. (2003). Improved shoot organogenesis from hypocotyl segments of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant* 39, pp. 490-495. <https://doi.org/10.1079/IVP2003458>

- Debnath, S. C. (2004). In vitro Culture of Lowbush Blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait) . Small Fruits Review, pp. 393-4087. https://doi.org/10.1300/J301v03n03_16
- Debnath, S. C. (2006). Influence of propagation method and indole-3-butyric acid on growth and development of in vitro- and ex vitro- derived lingonberry plants. *Can J. Plant Sci*, pp. 235-243. DOI: 10.4141 / p04-142
- Debnath, S. C. (2006). Propagation of *Vaccinium* in vitro. *International Journal of Fruit Science*, pp. 47-71. <https://doi.org/10.3390/molecules25040788>
- Debnath, S., y McRae, K. (2001). An efficient in vitro shoot propagation of Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) by axillary bud proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology–Plant*, 37, pp. 243-249. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0043-9>
- Domínguez, A., Domínguez, J., Cruz, S., Santacruz, A., Barrientos, A., Padilla, S., y Gutiérrez, M. (2016). In vitro propagation of guava selections (*Psidium guajava* L.). *Revista fitotecnia mexicana publ. por la Sociedad Mexicana de Fitogenética*, 39(3), pp. 285-295, DOI: 10.35196/rfm.2016.3.285-295
- Dueñas Mendoza, F. P. (2017). Establecimiento in vitro del frutal andino mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) para la aplicación de agrotecnologías de multiplicación acelerada. [Tesis de grado de Ingeniería Industrial y de Alimentos: Universidad de las Américas]. <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/8715>
- Elsen, A., Declerck, S., y De Waele, D. (2001). Effects of *Glomus intrarradices* on the reproduction of the burrowing nematode (*Radopholus similis*) in dixerenic culture. *Mycorrhiza*, 11, pp. 49-51. DOI: 10.1007 / s005720100100

Fonteno, W., Harden, C., y Brewster, J. (2000). Procedures for determining physical properties of horticultural substrates using the NCSU porometer. Horticultural Substrate Laboratory. North Carolina., pp. 2-21.

García, L. (2015). Uso de moringa como biofertilizante foliar en pimiento variedad sweet/cubanelle *Capsicum annum* L. en la granja Santa Inés. [Tesis de grado en Ingeniería Agronomica: Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias].
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/1144>

George, E., Hall, M., y De Klerk, G. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. Springer, 1, 2-3, pp. 205-219. <https://investigacionfitopatologiaumar.files.wordpress.com/2016/06/plant-propagation.pdf>

Gil Rivero, A. E., López Medina, S. E., y López Zavaleta, A. (2017). Aclimatación de plántulas in vitro de *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. (Gesneriaceae) “violeta africana” a condiciones de invernadero. *Arnaldoa*, 24 (1), pp. 343 - 350. <http://dx.doi.org/http://doi.org/10.22497/arnaldoa.241.24116>.

Gonzales, M., Lopez, M., Valdez, A., y Ordas, R. (2000). Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from fieldgrown plants. *Ann.appl Biol*, pp. 073-078.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2000.tb00059.x>

González, M., y Rodríguez, A. (2009, Julio 06). La Sistemática y Propagación de las plantas.
<http://xn--sistemicaypropagacin-f0b24b.blogspot.com/2009/07/propagacion-sexual-y-asexual-de-las.html>

- Hernández, C. (2001). Efecto del hongo micorriza (*Glomus intraradices* Schenk & Smith) en el crecimiento del portainjerto mexícola (*Persea americana* Mili) cultivado bajo cinco tratamientos de fertilización. [Tesis de licenciatura de Ingeniería Agrónoma: Universidad Católica de Valparaíso]. http://www.avocadosource.com/papers/Chile_Papers_A-Z/G-H-I/HernandezClaudio2001.pdf
- Hidalgo Loggiodice, P. R., Sindoni Vielma, M., y Méndez Natera, J. R. (2009). Importancia de la selección y manejo adecuado de sustratos en la producción de plantas frutales. *Revista UDO Agrícola*, 9 (2), pp. 282-288.
<http://udoagricola.orgfree.com/V9N2UDOAgr/V9N2UDOAgr.pdf>
- Hine-Gómez, A., y Abdelnour-Esquivel, A. (2013). Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L). *Tecnología en Marcha*, 26, pp. 64-71. DOI: 10.18845/tm.v26i4.1584
- Intagri. (2020, septiembre 19). Cultivo In Vitro de Células y Tejidos Vegetal. <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetal>
- Jaakola, L., Tolvanen, A., Laine, K., y 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, pp. 73-77.
- Jimenez, M. V. (2004). Determinación de métodos para producción de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), con fines de propagación y producción comercial. [Tesis de grado: Universidad San Francisco de Quito]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/864>

- León, D. (2006). Evaluación y caracterización de micorrizas arbusculares asociadas a la yuca (*Manihot esculenta* sp) en dos regiones de la amazonía colombiana. [Tesis de grado: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Microbiología Agrícola y Veterinaria]. <http://hdl.handle.net/10554/8323>
- Litwinczuk, W., y Szczerba, G. W. (2005). Field performance of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. 'Herbert' propagated by cuttings and tissue culture. *Scientia Horticulturae*, pp. 162-169. DOI: 10.1016/j.scienta.2005.02.025
- Loján, L. (2003). El verdor de los andes ecuatorianos: realidades y promesas. Proyecto Desarrollo Forestal Participativo en los Andes. p. 200.
- Luby, J., Ballington, J., Draper, A., Pliszka, K., y Austin, M. (1991). Blueberries and cranberries (*Vaccinium*). *Acta Hort*, 290, pp. 393-458. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1991.290.9>
- Malajovich, M., y Soares, V. (2004). Biotecnología: enseñanza y divulgación. Instituto de Tecnología ORT de Río de Janeiro.
- Meiners, J., Schwab, M., y Szankowski, I. (2007). Efficient in vitro regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 89, pp. 169-176. <http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242015000100001&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0377-9424.
- Meneses, L., Dueñas, F., Recto, L., y Morillo, E. (2018). Establecimiento in vitro de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) y Avances en su Micropropagación. INIAP, UDLA, pp. 7-8. <https://repositorio.iniap.gob.ec/jspui/handle/41000/5029>

- Mikola, P. (1965). Studies on the ectendotrophic mycorrhiza of pine. *Acta Forestina Fennia* , pp. 1-56. <https://doi.org/10.14214/aff.7160>
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*, pp. 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Noboa, V. (2010). Efecto de Seis Tipos de Sustratos y Tres Dosis de Ácido Naftalenacético en la Propagación Vegetativa de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). [Tesis de grado en Ingeniería Forestal: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/713/1/33T0067.pdf>
- Noé, N., y Bonini, L. (1996). Leaf anatomy of highbush blueberry grown in vitro and during acclimatization to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum*, pp. 19-25. <https://doi.org/10.1007/BF02879626>
- Noé, N., & Eccher, T. (1994). Influence of irradiance on in vitro growth and proliferation of *Vaccinium corymbosum* (Highbush blueberry) and subsequent rooting in vivo. *Physiologia Plantarum*, pp. 273-275. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb00430.x>
- Nogales Garcia, A. M. (2006). Estudio de la interacción entre el hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices* Schenck y Smith y el hongo patógeno *Armillaria mellea* (Vahl:fr) P. Kuhn en vid. [Tesis de tecnología de Biología vegetal: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, en el Centro de Cabriils]. https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/953/AMNG_TESIS.pdf?..

- Olmos, S., Luciani, G., y Galdeano, E. (2016). Métodos de propagación y conservación de germoplasma. INTA Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. pp. 353-362.
- Ostrolucká, M., Libiaková, G., Ondrusková, E., y Gajdosová, A. (2004). In vitro propagation of *Vaccinium* species. Acta Universitatis Latviensis, pp. 207-212.
<http://eeb.lu.lv/EEB/2004/Ostrolucka.pdf>
- Páramo, C. (2018). Estudio del efecto hormético y antimicrobiano de nanoplatina en la regeneración in vitro de *Rubus Glaucus* Benth. [Tesis de grado en Ingeniería Agropecuaria: Universidad de las Fuerzas Armadas-E.S.P.E- I.A.S.A.].
<https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/14243>
- Patiño, C. (2012). Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas. [Trabajo de especialización en Biotecnología Agraria: Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD)]. <https://docplayer.es/4376377-Avances-de-la-micropropagacion-in-vitro-de-plantas-lenosas.html>
- Pelizza, T., Damiani, C., Rufato, A., De Souza, A., Ribeiro, M., y Schuch, M. (2011). Microestaquia em mirtileiro com diferentes porções do ramo e substratos. *Bragantia*, Campinas, 70(2), pp. 319-324. <https://www.scielo.br/pdf/brag/v70n2/10.pdf>
- PhytoTechLabs. (2020, Septiembre 18). PhytoTech Labs. <https://phytotechlab.com/lloyd-mccown-woody-plant-modified-basal-salt-mixture.html>
- Pindstrup. (2018, Diciembre 17). interempresas.net. Canales sectoriales:
<https://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/230301-La-importancia-del-sustrato-en-arandano.html>

- Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadlecěk, P., Haisel, D., y Plzáková, S. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions . *Biologia Plantarum*, pp. 481-497.
<https://doi.org/10.1023/A: 1002688208758>
- Projar. (2016). Sustraberry Arándano.<https://www.projar.es/productos/productos-hortofruticultura-jardineria/sustratos-profesionales/sustratos-specialist/sustratos-profesionales-berries/sustrato-arandano/>
- Puche, F. (2012). Componentes del Medio de Cultivo. *Biotecnología ITCA*. Puche, F. (2012). Componentes del Medio de Cultivo. *Biotecnología ITCA*.
- Quintana Roo, J. S. (2014). Aislamiento y reproducción de hongo micorriza arbuscular (*Glomus intraradices*) en plantas de maíz (*Zea mays*). [Informe final de residencia en Ingeniería Agropecuaria: Instituto Tecnológico De La Zona Maya]. http://www.itzonamaya.edu.mx/web_biblio/archivos/res_prof/agro/agro-2014-18.pdf
- Rache Cardenal, L., y Pacheco Maldonado, J. (2010). Propagación in vitro de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). *Acta bot. bras.*, pp. 1086-1095.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062010000400024>.
- Ramírez, M., y Williams, D. (2003). Guía agro–culinaria de Cotacachi, Ecuador y alrededores. IPGRI-Américas. <http://biblioteca.culturaypatrimonio.gob.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblio number=186987>
- Recto, L. (2018). Micropropagación de plántulas de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) bajo condiciones in vitro. [Tesis de grado en Ingeniería Agroindustrial y de Alimentos: Universidad de las Américas]. <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10389>

- Reed, B. M., y Abdelnour-Esquivel, A. (1991). The Use of Zeatin to Initiate in Vitro Cultures of *Vaccinium* Species and Cultivars. *HortScience*, pp. 1320-1322.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.26.10.1320>
- Richards, S., Warneke, J., y Aljibury, F. (1964). Physical properties of soil mixes used by nurseries. *Calif. Agr.* 18(5), pp. 12-13. <http://calag.ucanr.edu/Archive/?article=ca.v018n05p12>
- Sagretín, M. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *ArgenBio*. http://www.argenbio.org/images/La_bioteecnologia/Cap_2/Cultivos_celulares_II.pdf
- Salgado-Barreiro, C., Bravo-Patiño, A., Wang, E., y Cárdenas-Navarro, R. (2012). Efecto de la inoculación con *Glomus intraradices* y de la fertilización nitrogenada en el crecimiento de plantas de fresa. *Scientia Agropecuaria*, pp. 171-179. <https://www.redalyc.org/pdf/3576/357633702008.pdf>
- Schenck, N., y Pérez, Y. (1998). Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. INVAM, University of Florida. <https://www.worldcat.org/title/manual-for-the-identification-of-va-mycorrhizal-fungi/oclc/24677253>
- Schübler, A., Schwarzott, D., y C. W. (2001). A new fungal Phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* ,105, pp. 1413-1421. DOI: 10.1017 / S0953756201005196
- Shufang, F., Dawei, J., Xiangying, W., Jianjun, C., Richard C., B., Zhixiang, Z., y Xueming, W. (2017). Micropropagation of blueberry 'Bluejay' and 'Pink Lemonade' through in vitro

shoot culture. *Scientia Horticulturae*, 226, pp. 277-284. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201800317214>

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*, pp. 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.06.028>

Trujillo, D. (2008). Cultivo in vitro del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). [Tesis de grado en Biotecnología: Universidad San Francisco de Quito]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/794>

UDL. (2020, septiembre 18). Universitat de Lleida. Retrieved from T5: Medios: <http://cv.udl.cat/cursos/76304/t5/t5.htm>

Urbina, V. (2009). La propagación de las plantas y la conservación y difusión de las variedades frutales. <http://ocw.udl.cat/enginyeria-i-arquitectura/fructicultura/continguts-1/l-7/monografia-no-7-cap.-1.-la-propagacion-de-las-plantas>

Vaca I., y Landázuri, P. (2013). Evaluación de tres niveles de nitrógeno en medio de cultivo, en las fases de enraizamiento in vitro y adaptación a sustrato de *Rubus glaucus* (Benth). *La Granja*, 18 (2). <https://www.redalyc.org/pdf/4760/476047402005.pdf>

Valencia Juárez, M. C., Escobedo López, D., Díaz Espino, L. F., y González Pérez, E. (2019). Aclimatación ex vitro de plántulas de *Fragaria x ananassa* Duch. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10 (1). <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i1.1633>

Vallejo, D. (2008). Fomento al mortiño (*Vaccinium meridionale*) como especie promisoría del Parque Regional Arví.