



Evaluación del medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de células madre y suspensiones celulares de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) a partir de frutos inmaduros

Acosta España, Johnatan Andrés

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación previo a la obtención de Ingeniero en Biotecnología

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz Ph. D.

2 de febrero de 2023

Resultado del Análisis de Google Assignments

1/2/23, 14:30

Proyecto de Titulación

Informe de originalidad

NOMBRE DEL CURSO

Proyecto de Titulación SII OCT 22 - MAR 23

NOMBRE DEL ALUMNO

JOHNATAN ANDRES ACOSTA ESPAÑA

NOMBRE DEL ARCHIVO

JOHNATAN ANDRES ACOSTA ESPAÑA - TESIS

SE HA CREADO EL INFORME

1 feb 2023

Resumen

Fragmentos marcados	1	0,1 %
Fragmentos citados o entrecuillados	0	0 %

Coincidencias de la Web

greenimportsol.com	1	0,1 %
--------------------	---	-------

1 fragmento

Fragmento del alumno MARCADO

La **6-bencilaminopurina (6-BAP)** es un regulador de crecimiento sintético perteneciente a la familia de las **citoquininas**. Es empleado para promover respuestas de crecimiento dando lugar...

Mejor coincidencia en la Web

6 BENCILAMINOPURINA (6 BAP – GREEN RG 99%) es un regulador de crecimiento de las plantas de la clase de las **citoquininas**. - Aplicaciones: 6 BAP – GREEN RG 99% se ...

6 Bencil Aminopurina 6 BAP - GREEN RG 99% <https://www.greenimportsol.com/producto/6-bencilaminopurina-6-bap-green-rg-99/>



Certificación



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: “**Evaluación del medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de células madre y suspensiones celulares de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) a partir de frutos inmaduros**” fue realizado por el señor **Acosta España, Johnatan Andrés**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 2 de febrero de 2023



Firmado electrónicamente por:
MONICA BEATRIZ
JADAN GUERRERO

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz Ph. D.

C. I.: 1802278562

Responsabilidad de Autoría



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Acosta España, Johnatan Andrés** con cédula de ciudadanía n° 1003678867, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Evaluación del medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de células madre y suspensiones celulares de mortño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) a partir de frutos inmaduros** 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, 2 de febrero de 2023

Acosta España, Johnatan Andrés

C.I.: 1003678867

Autorización de Publicación



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Acosta España, Johnatan Andrés** con cédula de ciudadanía n° 1003678867, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Evaluación del medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de células madre y suspensiones celulares de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) a partir de frutos Inmaduros** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 2 de febrero de 2023

Acosta España, Johnatan Andrés

C.I.: 1003678867

Dedicatoria

A mi madre, por nunca dejarme solo, apoyarme en mis decisiones y combatir conmigo las
batallas más duras

A mi padre, por ser un gran apoyo en mi vida, no dejar que me rinda y darme aliento en los
momentos difíciles

A mis hermanos, porque a pesar de todo sé que puedo contar con ellos en cualquier momento

A Darwin, por todo el amor, compañía y apoyo que me ha brindado

Johnatan Andrés Acosta España

Agradecimientos

A mi familia, por estar conmigo en todo momento sin importa que sea malo o bueno, Por enseñarme que debo seguir a adelante a pesar de que el camino sea duro. Por cada consejo que me guio a ser quien soy.

A Darwin, por toda la ayuda que ha brindado, por todos los consejos y enseñanzas que supo regalarme. Y por sobre todo, por ese amor incondicional que día a día me ayuda a querer ser mejor persona.

A Mónica Jadán y Andrea Ortega, por darme la bienvenida al Laboratorio de Cultivo de Tejidos ESPE y que con sus conocimientos me guiaron para desarrollar de la mejor manera mi trabajo de titulación.

Johnatan Andrés Acosta España

Índice de Contenido

Resultado del Análisis de Google Assignments	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Resumen	14
Abstract	15
Capítulo I: Introducción	16
Planteamiento del Problema	16
Justificación del Problema	16
Objetivos	18
Objetivo General	18
Objetivos Específicos	18
Hipótesis	18
Capítulo II: Marco Teórico	19
Mortino (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth.)	19
Origen y Distribución	19
Taxonomía	20
Descripción Botánica	20
Propiedades y Beneficios	21
Explotación y Comercialización	22
Cultivo <i>in vitro</i>	22
Cultivo de Tejidos Vegetales	22

Callogénesis.....	23
Suspensiones Celulares	24
Medios de Cultivo	24
Medio de Cultivo Murashige & Skoog (MS)	25
Medio de Cultivo para Plantas Leñosas (WPM)	26
Reguladores de Crecimiento	27
Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético	28
6-Bencilaminopurina	28
Recuento Celular	29
Hemocitómetro.....	29
Capítulo III: Metodología.....	31
Fase de Campo	31
Recolección del Material Vegetal	31
Fase de Laboratorio.....	31
Selección del Material Vegetal	31
Unidad Experimental y Condiciones de Cultivo	32
Desinfección.....	32
Inducción a Callogénesis.....	34
Establecimiento de Suspensiones Celulares	35
Recuento Celular a Partir de Suspensiones Celulares.....	36
Análisis de Datos	37
Capítulo IV: Resultados	38
Desinfección.....	38
Porcentajes de Contaminación.....	38
Comparación de los Tratamientos.....	39
Inducción a Callogénesis.....	42

	10
Porcentajes de Inducción	42
Comparación de los Tratamientos.....	43
Cambio Morfológicos Durante la Inducción a Callogénesis	45
Oxidación y Viabilidad	46
Establecimiento de Suspensiones Celulares	47
Recuento Celular	47
Comparación de los Tratamientos.....	49
Capítulo V: Discusión	52
Desinfección.....	52
Inducción a Callogénesis.....	54
Establecimiento de Suspensiones Celulares	56
Capítulo VI: Conclusiones	58
Capítulo VII: Recomendaciones	59
Bibliografía	60

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Clasificación taxonómica del mortiño</i>	20
Tabla 2 <i>Componentes del medio de cultivo MS</i>	26
Tabla 3 <i>Componentes del medio de cultivo WPM</i>	27
Tabla 4 <i>Concentración de solución fungicida y tiempo de inmersión a los que se sometieron los frutos inmaduros de mortiño</i>	33
Tabla 5 <i>Medios de cultivo y concentraciones de 2,4-D empleados en la inducción a callogénesis a partir de frutos inmaduros de mortiño</i>	34
Tabla 6 <i>Medios de cultivo y concentraciones de 2,4-D empleados para la formación de suspensiones celulares a partir de células madre de mortiño</i>	35
Tabla 7 <i>Porcentajes de contaminación en explantes introducidos según el tratamiento empleado</i>	39
Tabla 8 <i>Prueba de Shapiro-Wilks modificado para los resultados obtenidos de los porcentajes de contaminación</i>	40
Tabla 9 <i>Porcentajes de inducción obtenidos a los 28 días de cultivo</i>	42
Tabla 10 <i>Prueba de Shapiro-Wilks modificado para los resultados obtenidos de los porcentajes de inducción a callogénesis</i>	43
Tabla 11 <i>Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para los datos de inducción a callogénesis a los 28 días de cultivo</i>	44
Tabla 12 <i>Resultados del recuento celular de los tratamientos aplicados</i>	47
Tabla 13 <i>Prueba de Shapiro-Wilks modificado para los resultados obtenidos del recuento celular</i>	49
Tabla 14 <i>Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para los datos de concentración celular a los 14 días de cultivo</i>	50

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Distribución geográfica del mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth.) a nivel continental y nacional.....</i>	19
Figura 2 <i>Fruto del mortiño Fruto del mortiño.....</i>	21
Figura 3 <i>Estructura química del ácido 2,4-diclorofenoxiacético</i>	28
Figura 4 <i>Estructura química de la 6-bencilaminopurina.....</i>	29
Figura 5 <i>Cámara de Neubauer para el recuento celular.....</i>	30
Figura 6 <i>Divisiones de la zona de conteo de una cámara de Neubauer.....</i>	30
Figura 7 <i>Selección de los frutos inmaduros de mortiño.....</i>	31
Figura 8 <i>Proceso de desinfección de frutos inmaduros de mortiño.....</i>	33
Figura 9 <i>Especificaciones para el recuento celular manual en cámara de Neubauer.....</i>	36
Figura 10 <i>Porcentajes de viabilidad y contaminación en el tratamiento DT3.....</i>	38
Figura 11 <i>Porcentajes de contaminación obtenidos con los diferentes tratamientos durante la desinfección de frutos inmaduros de mortiño</i>	39
Figura 12 <i>Comparación de medias de los porcentajes de contaminación – Prueba de Duncan</i>	41
Figura 13 <i>Frutos inmaduros de mortiño contaminados y no contaminados.....</i>	41
Figura 14 <i>Porcentaje de inducción a células madre en frutos inmaduros de mortiño a los 28 días de cultivo</i>	43
Figura 15 <i>Formación de células madre de mortiño en medio de cultivo semisólido con 2,4-D y 6-BAP.....</i>	45
Figura 16 <i>Cambios morfológicos en frutos inmaduros de mortiño durante la inducción a callogénesis en un período de 56 días de cultivo</i>	46
Figura 17 <i>Crecimiento celular observado durante el período de cultivo</i>	48
Figura 18 <i>Medias del recuento celular de suspensiones celulares de mortiño a los 14 días de cultivo.....</i>	48

Figura 19 *Aumento de la turbidez del medio de cultivo líquido en matraces inoculados 51*

Resumen

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) es una planta endémica de los Andes, su fruto posee un gran valor nutricional y cuenta con una alta concentración de metabolitos secundarios con capacidad antioxidante. En los últimos años, el interés por los frutos del mortiño ha incrementado, sin embargo no existen cultivos comerciales; por lo tanto, los ecosistemas donde se encuentra el mortiño se ven afectados por la cosecha desmedida de sus frutos. La presente investigación busca establecer *in vitro* células madre a partir del fruto inmaduro del mortiño para el establecimiento de suspensiones celulares; con miras a futuros estudios sobre la producción de metabolitos secundarios de interés y reducir el consumo inmoderado del material silvestre. Para la desinfección del material vegetal la aplicación de una solución fungicida a base de sulfato de cobre pentahidratado (Skul 27[®]) al 2% (v/v) proporcionó una tasa de contaminación del 10%. Durante la inducción a callogénesis se evaluaron medios de cultivo enriquecidos con sales Murashige & Skoog (MS) y sales Woody Plant Medium (WPM) suplementados con los reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (6-BAP) y distintas concentraciones del 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); el tratamiento con mejores resultados consistió en el medio de cultivo WPM suplementado con 2 mg/L de 6-BAP y 4 mg/L de 2,4-D con un 81.67% de formación de células madre. En el establecimiento de suspensiones celulares, se determinó que el medio de cultivo enriquecido con sales MS y suplementado con 2 mg/L de 6-BAP y 4 mg/L de 2,4-D permitió un mayor crecimiento celular, obteniendo una concentración celular de 83729 células/mL.

Palabras clave: *Vaccinium floribundum* Kunth., metabolitos secundarios, desinfección, inducción a callogénesis, concentración celular.

Abstract

Mortño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) is a plant endemic to the Andes, its fruit has great nutritional value and has a high concentration of secondary metabolites with antioxidant capacity. In recent years, interest in the fruits of mortño has increased, however there are no commercial crops; therefore, the ecosystems where mortño is found are affected by the excessive harvest of its fruits. The present investigation seeks to establish *in vitro* stem cells from the immature fruit of mortño for the establishment of cell suspensions; with a view to future studies on the production of secondary metabolites of interest and reduce the immoderate consumption of wild material. For the disinfection of plant material, the application of a fungicide solution based on pentahydrate copper sulfate (Skul 27[®]) at 2% (v/v) provided a contamination rate of 10%. During the induction of callogenesis, culture media enriched with Murashige & Skoog salts (MS) and Woody Plant Medium (WPM) salts supplemented with the growth regulators 6-benzylaminopurine (6-BAP) and different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) were evaluated.; the treatment with the best results consisted of the WPM culture medium supplemented with 2 mg/L of 6-BAP and 4 mg/L of 2,4-D with 81.67% formation of stem cells. In the establishment of cell suspensions, it was determined that the culture medium enriched with MS salts and supplemented with 2 mg/L of 6-BAP and 4 mg/L of 2,4-D allowed greater cell growth, obtaining a higher cell concentration. of 83729 cells/mL.

Key words: *Vaccinium floribundum* Kunth., secondary metabolites, disinfection, callogenesis induction, cell concentration.

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del Problema

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) es una planta andina propia de varios países de Latinoamérica como Perú, Ecuador y Colombia. Posee varias propiedades, tales como alimenticias, ornamentales, producción de forraje, entre otras. En Ecuador su fruto es muy utilizado para la elaboración de bebidas tradicionales y obtención de tintes duraderos (Coba Santamaría *et al.*, 2012).

El fruto posee propiedades antioxidantes por la presencia de compuestos conocidos como metabolitos secundarios, de los cuales destaca el grupo de antocianinas. Las antocianinas se caracterizan por la eliminación de radicales libres en los procesos de oxidación (Contreras *et al.*, 2015).

Por sus propiedades antioxidantes, esta planta se ha vuelto de interés para llevar a cabo estudios con el fin de aprovechar sus beneficios en varios campos como la medicina, la alimentación y la cosmética (Li y otros, 2016); incluso en la elaboración de pigmentos gracias a su capacidad de aportar con colores que van desde rojo hasta azul (Coba Santamaría *et al.*, 2012).

Justificación del Problema

En la actualidad existe interés por la producción *in vitro* de plantas, ya sea para uso comercial, ornamental o industrial; esto ha dado cabida a un gran potencial de investigación para el desarrollo de protocolos estandarizados de establecimiento *in vitro* con el fin de asegurar una producción eficaz de plantas.

Al igual que otras plantas, el mortiño ha despertado interés por sus propiedades antioxidantes que benefician a la salud por su capacidad de reducir los niveles de estrés causado por la presencia de radicales libres en las células. Así mismo, posee capacidad

protectora contra los rayos ultravioletas provenientes del sol y se emplea en la medicina tradicional ecuatoriana para ayudar a tratar los síntomas del reumatismo, fiebre, cólicos y dolencias de hígado, riñones y pulmones (Coba Santamaría *et al.*, 2012). Además, cuenta con la capacidad de regenerar suelos quemados, por lo cual es utilizado en la reforestación de páramos (Llvisaca-Contreras *et al.*, 2022).

El cultivo de suspensiones celulares es uno de los métodos más efectivos para la producción de metabolitos secundarios con una alta pureza y en gran cantidad. El emplear este sistema puede garantizar un suministro continuo de varios compuestos naturales especializados con una calidad uniforme en comparación a métodos tradicionales de extracción (Cetim *et al.*, 2014).

Debido a esto, el presente trabajo pretende desarrollar protocolos estandarizados para el establecimiento *in vitro* del fruto inmaduro de mortiño, buscando proveer una fuente de materia prima para la obtención de metabolitos secundarios mediante suspensiones celulares a partir de células madre. Favoreciendo la producción de dichos compuestos y evitando así que se llegue a presentar un consumo excesivo del material que se encuentra en la naturaleza.

No existen cultivos comerciales de mortiño debido a que su desarrollo presenta una baja tasa de crecimiento (2cm/mes o menos); por este motivo con esta investigación se busca aprovechar la producción del material vegetal *in vitro*. Con el desarrollo de suspensiones celulares se puede mejorar la producción de metabolitos secundarios con miras a realizar nuevos estudios. Además, es posible formar una base de datos sobre el mortiño, sus propiedades y aplicaciones; información que no se encuentra recopilada en bases de datos del Ecuador.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de células madre y suspensiones celulares de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) a partir de frutos inmaduros.

Objetivos Específicos

- Establecer un protocolo de desinfección para la introducción *in vitro* de frutos inmaduros de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.).
- Establecer un medio de cultivo para la producción de células madre a partir de frutos inmaduros de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.).
- Determinar un medio de cultivo para la producción de suspensiones celulares a partir de las células madre de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) cultivadas *in vitro*.

Hipótesis

A partir de frutos inmaduros de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) se obtiene células madre *in vitro* para el establecimiento de suspensiones celulares.

Capítulo II: Marco Teórico

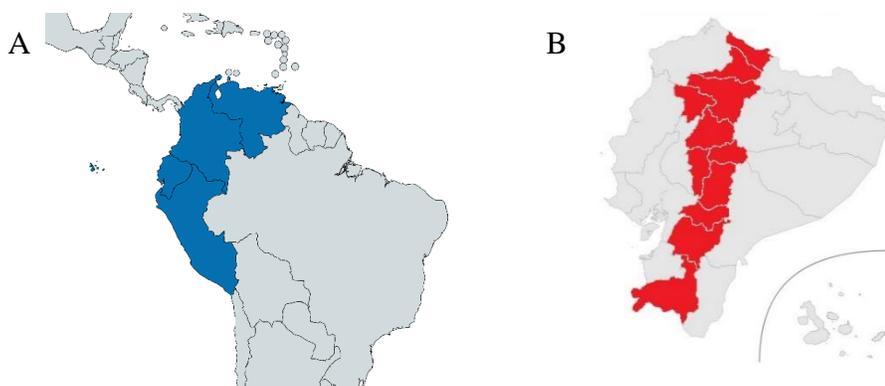
Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.)

Origen y Distribución

El mortiño es una planta endémica del noroccidente de América del Sur, particularmente de los Andes (Figura 1A). En Perú se identifica comúnmente como macha macha, congoña, pushgay; en Colombia lo llaman agraz, y en Ecuador se lo conoce como mortiño, uva de los Andes, manzanilla de cerro, raspadura quemada o uva de monte. En el Ecuador, el mortiño se asienta desde Carchi hasta Loja (Figura 1B), entre los 1600 hasta los 3800 m.s.n.m. donde las temperaturas varían entre 8 °C a 16 °C, en climas templados y fríos, con suelos húmedos y bien drenados; formando parte de los bosques seco montano bajo y húmedo montano (Coba Santamaría *et al.*, 2012).

Figura 1

Distribución geográfica del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth.) a nivel continental y nacional.



Nota. A) Distribución geográfica del mortiño en América del Sur. B) Distribución geográfica del mortiño en las provincias del Ecuador.

Taxonomía

El mortiño fue descrito por Carl Sigismund Kunth en 1879, definiéndolo como una planta angiosperma, perteneciente a la familia Ericaceae, cuyo nombre científico es *Vaccinium floribundum* Kunth., y su clasificación taxonómica completa se muestra en la Tabla 1 (Blanco & del Valle, 2009).

Tabla 1

Clasificación taxonómica del mortiño.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Ericales
Familia:	Ericaceae
Género:	<i>Vaccinium</i>
Especie:	<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth.

Nota. Adaptado de *Herbarium Mutisianum*, por Blanco & del Valle, 2009, CSIC.

Descripción Botánica

Es una planta tipo arbusto que puede alcanzar hasta los 3.5 m de altura como se indica en la Figura 2 (Torres *et al.*, 2010). Sus hojas son pequeñas con forma elíptica, ovalada u ovado-lanceada; además las flores se presentan con una coloración blanca a rosada y en algunos casos incluso pueden ser rojas, éstas se desarrollan en racimos de 6 a 10 flores formando inflorescencias; el fruto es una baya con un diámetro menor a 1 cm, en la inmadurez posee un color verde, mientras que el fruto maduro tiene un color negro azulado y su sabor es agrídulce (Llvisaca-Contreras *et al.*, 2022).

Figura 2

Fruto del mortiño.



Nota. Tomado de *Agraz Silvestre o Mortiño, Cómo se cosecha* [Fotografía], por Angel, 2014.

Propiedades y Beneficios

El mortiño ha pasado de ser conocido como un alimento ancestral usado por los aborígenes de las zonas cercanas a los páramos para llevar a cabo rituales considerándolo un fruto ceremonial, a ser valorado por su alto contenido de nutrientes y bajo contenido de grasas. Las bayas al consumirse aportan con agua (~80%), proteína (~0,7%), grasas (~1%), carbohidratos totales (~16.9%), fibra total (~7.6%), con un componente calórico de ~84kcal, por cada 100 g de fruta fresca. Además, se ha demostrado que posee una enorme variedad y contenido de micronutrientes tales como hierro, calcio, potasio, ácido ascórbico, tiamina, niacina, ácido pantoténico, riboflavina, entre otros (Castillo & de Janon, 2018).

Así mismo, el fruto maduro presenta altas concentraciones de antocianinas, polifenoles, derivados del ácido vanílico e hidroxibenzóico, proantocianidinas, derivados del ácido clorogénico e hidroxicinámico; esto evidencia una capacidad antioxidante de 1200 mg Trolox (análogo al antioxidante vitamina E) por cada 100 g de fruta fresca (Coba Santamaría *et al.*, 2012).

Explotación y Comercialización

Actualmente, en el Ecuador, son pocos los cultivos a nivel comercial del mortiño ya que generalmente se obtiene sus frutos de plantas silvestres en distintas zonas del país, actividad llevada a cabo por comerciantes denominados “buscamortiños”. Sin embargo, la demanda de su fruto se ha visto en aumento, lo que ha desencadenado una explotación mayor, viéndose afectado el ecosistema en que se encuentran estas plantas (Castillo & de Janon, 2018).

La época del año en que mayor demanda existe es a principios de noviembre, debido a la celebración del Día de los Difuntos, fechas en las cuales se realiza una bebida típica denominada Colada Morada. El valor aproximado de su fruto es de 4.50 USD por kilogramo, la venta de frutos se realiza mayormente en los diferentes mercados del Ecuador, sin embargo también se lo puede encontrar por un mayor precio en supermercados; a nivel internacional un kilogramo del fruto puede variar desde los 10.00 USD hasta los 17.00 USD (Idrovo, 2013).

Cultivo *in vitro*

Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos vegetales es el desarrollo de varias técnicas/tecnologías que permiten cultivar células, tejidos, órganos o incluso la producción de plantas completas empleando para ello medios artificiales (medios de cultivo) que sustituyen al uso de tierra. Dicho cultivo se lleva a cabo bajo condiciones controladas de temperatura, porcentaje de humedad, fotoperiodo, entre otras, lo que permite un minucioso manejo de las muestras para un óptimo crecimiento (Rodríguez M. , 2018).

El uso de estas técnicas genera plántulas con características genéticas, fisiológicas y morfológicas idénticas a la planta madre; las aplicaciones que ofrece son varias, algunas de ellas son la obtención de plantas libres de patógenos, generación de células madre (callos),

conservación de especies en peligro de extinción, producción de metabolitos secundarios, germinación de semillas recalcitrantes, entre otras (Recto, 2018).

Callogénesis

La formación de células madre cuando se seccionan tejidos vegetales es, particularmente en el caso de las dicotiledóneas, una reacción defensiva natural, que asegura el cierre de las heridas. En este caso el callo se forma a partir del cambium, y por ello, sobre el principio de los tejidos cambiales, fue que se establecieron los primeros cultivos de callos *in vitro*. Las células madre pueden ser obtenidas a partir de diferentes órganos vegetales, por ejemplo, hojas, nudos, entrenudos, raíces, parte de la flor, embriones (particularmente inmaduros) e incluso del endospermo. Especialmente propicios para el establecimiento de cultivos de células madre son los explantes de tejidos vegetales jóvenes (Valverde-Cerdas *et al.*, 2013).

Desde el punto de vista morfogénico la característica más importante de las células madre es la totipotencia, ya que con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces y embriones somáticos; dependiendo fundamentalmente del balance auxina:citoquinina en el medio de cultivo (Gómez, 1998). Siendo un balance eficiente una alta concentración de auxinas como 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA); y baja concentración de citoquininas como kinetina (KIN), la 6-bencilaminopurina (6-BAP) (Chawla, 2002).

Algunas de las especies que permiten el uso de una gran variedad de explantes para producir células madre, y principalmente capaces de regenerar una planta son *Daucus carota*, *Stylosanthes guianensis*, *Brassica napus*, *Medicago sativa*, *Nicotiana Tabacum* y *Trifolium repens* (Roca & Mroginski, 1991).

Suspensiones Celulares

Las suspensiones celulares constituyen una técnica de cultivo *in vitro* centrada en el uso de células libres y/o agregados celulares distribuidos en un medio de cultivo líquido con los nutrientes necesario para permitir el crecimiento y desarrollo de las células en agitación constante para la obtención de metabolitos, los cuales se producen gracias al control de las condiciones en que se desarrollan (López, 2019).

Existen tres métodos para establecer suspensiones celulares: 1) cultivo cerrado, donde no ingresa o sale medio de cultivo o células; 2) cultivo continuo cerrado, ingresando nuevo medio de cultivo y retirando el gastado pero sin extraer células en el proceso; y 3) cultivo continuo abierto, donde se ingresa nuevo medio de cultivo retirando el gastado con pequeñas porciones de células durante el proceso (Pérez, 2018).

Medios de Cultivo

Un medio de cultivo es una sustancia nutritiva que puede ser líquida, semisólida o sólida, la cual posee todos los nutrientes necesarios para permitir el crecimiento de plántulas bajo condiciones favorables de temperatura y pH. Adicionalmente a los nutrientes básicos (carbohidratos, sales orgánicas, vitaminas y aminoácidos) es necesario en ocasiones añadir reguladores de crecimiento para potenciar o favorecer el desarrollo de las plántulas, brotes, células madre, entre otros; según el fin que se desea. La concentración de todos estos componentes dependerá del objetivo del estudio (Recto, 2018).

Existe una gran variedad de medios de cultivo que pueden ser empleados para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, tales como: Murashige & Skoog, Linsmaier y Skoog, medio para plantas leñosas, Nitsch, White, entre otros (Suárez Padrón, 2020).

Medio de Cultivo Murashige & Skoog (MS)

El medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) fue formulado en 1962 por Murashige y Skoog, durante un estudio para la optimización de formación de células madre de tabaco (Murashige & Skoog, 1962). Este medio de cultivo es empleado comúnmente para el cultivo de células vegetales y se emplea para micropropagación, cultivo de células madre y órganos, formación de suspensiones celulares, entre otras; ya que proporciona todos los macroelementos y microelementos esenciales para el desarrollo de células vegetales (Smith, 2013).

Su composición consta de una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas y aminoácidos como se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2*Componentes del medio de cultivo MS.*

Componente	Concentración (g/L)
Macroelementos	
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	165.0
Cloruro de calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	44.0
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	37.0
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	17.0
Nitrato de potasio (KNO_3)	190.0
Micronutrientes	
Ácido bórico (H_3BO_3)	0.620
Cloruro de cobalto ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.0025
Sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	2.78
Sulfato manganoso ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	1.69
Yoduro de potasio (KI)	0.083
Molibdato de sodio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.025
Sulfato de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.86
Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica ($FeNaEDTA$)	3.724
Sulfato cúprico ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.0025
Vitaminas	
Inositol	0.1
Ácido nicotínico	0.0005
Clorhidrato de piridoxina	0.0005
Clorhidrato de tiamina	0.0001
Glicina	0.002

Nota. Adaptado de *Plant tissue culture: Techniques and experiments*, por Smith, 2013, Elsevier.

Medio de Cultivo para Plantas Leñosas (WPM)

El medio para plantas leñosas (WPM, por sus siglas en inglés) fue originalmente desarrollado por Lloyd y McCown en el año 1981, con el objetivo de cultivar brotes de laurel de montaña (Lloyd & McCown, 1980). Desde entonces el medio de cultivo WPM se usa como un

medio estándar para el cultivo de muchas variedades de plantas leñosas, gracias a que provee los nutrientes necesarios para su desarrollo (Schuchovski & Biasi, 2019).

Los componentes principales de este medio de cultivo se encuentran detallados en la Tabla 3.

Tabla 3

Componentes del medio de cultivo WPM.

Componente	Concentración (mg/L)
Macronutrientes	
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	400.0
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	180.7
Cloruro de calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	72.5
Nitrato de calcio [$Ca(NO_3)_2$]	386.0
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	170.0
Sulfato de potasio (K_2SO_4)	990.0
Micronutrientes	
Ácido bórico (H_3BO_3)	6.25
Sulfato manganoso ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	22.3
Sulfato de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	8.6
Sulfato cúprico ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.25
Molibdato de sodio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.25

Nota. Adaptado de *In vitro establishment of 'delite' rabbiteye blueberry microshoots*, por Schuchovski & Biasi, 2019, Horticulturae.

Reguladores de Crecimiento

Las plantas naturalmente son capaces de producir sustancias que las ayudan en su desarrollo y crecimiento, dichas sustancias son conocidas como fitorreguladores o reguladores de crecimiento, las cuales en pequeñas cantidades promueven el desarrollo de raíces, tallos, evitan la senescencia de frutos u hojas y producen formación de células madre. Los grupos

principales de este tipo de sustancias son: auxinas, citoquininas, giberelinas y abscisinas (Dueñas, 2017).

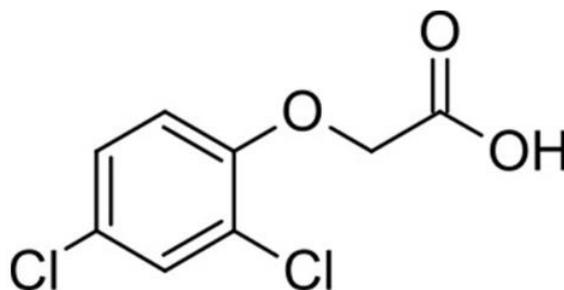
Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) se trata de un regulador de crecimiento sintético, perteneciente a la familia de las auxinas. Este compuesto en altas concentraciones es considerado un herbicida altamente tóxico, sin embargo en bajas concentraciones actúa como un potente regulador de crecimiento (Özkul *et al.*, 2016).

Su fórmula química es $C_8H_8Cl_2O_3$ y su estructura química se puede observar en la Figura 3. Es un análogo del ácido indol-3-acético (AIA), capaz de estimular el crecimiento y división celular, es empleado en la inducción de tejidos embriogénicos. En el cultivo de tejidos vegetales provoca la dediferenciación (inducción a células madre), incorporándolo directamente al medio de cultivo (Endress, 1994).

Figura 3

Estructura química del ácido 2,4-diclorofenoxiacético.



Nota. Tomado de *2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid* [Fotografía], por Toku-E, 2022.

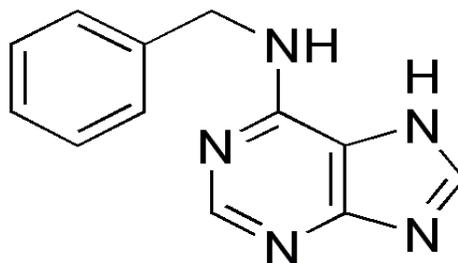
6-Bencilaminopurina

La 6-bencilaminopurina (6-BAP) es un regulador de crecimiento sintético perteneciente a la familia de las citoquininas. Es empleado para promover respuestas de crecimiento dando

lugar al desarrollo de las plantas, especialmente estimulando la división celular en frutos. Habitualmente es más efectivo para toda clase de vegetales de hojas verdes (Thuruthikkattil Ram & Jose, 2015). Su fórmula química es $C_{12}H_{11}N_5$ y la estructura de este compuesto se muestra en la Figura 4.

Figura 4

Estructura química de la 6-bencilaminopurina.



Nota. Tomado de 6-Benzylaminopurine [Imagen], por NCBI, 2022.

Recuento Celular

Para los ensayos en que se requiere medir el crecimiento celular se puede emplear varias técnicas como determinación del aumento de la masa de las células, recuento directo por microscopio, recuento directo mediante contadores electrónicos, método de turbidez, entre otros. Cada uno de estos métodos tienen sus ventajas y desventajas que se deben tener en consideración para realizar una correcta determinación del número de células (Greer *et al.*, 2009).

Hemocitómetro

El recuento celular por microscopio se trata de una técnica manual que se lleva a cabo con ayuda de una cámara de conteo, también llamada hemocitómetro. El hemocitómetro más empleado durante décadas es la cámara de Neubauer. Como se aprecia en la Figura 5, se trata de una placa de vidrio de 30 x 70 mm y 4 mm de espesor con forma de portaobjetos. La

región para el conteo tiene dos áreas regladas cuadradas con depresiones a sus lados y entre cada una estás, asemejándose a la letra “H” (García Borges, 2016).

Figura 5

Cámara de Neubauer para el recuento celular.

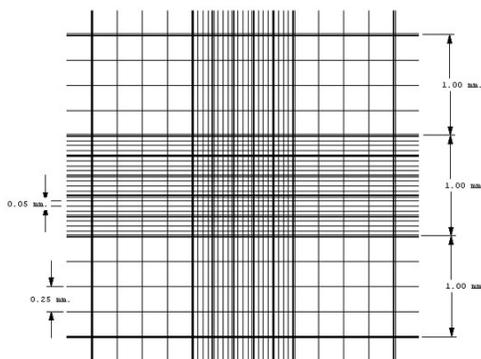


Nota. Tomado de *Manual cell counting with Neubauer chamber* [Fotografía], por LaboratoryInfo, 2022.

Cada área reglada mide 3 mm^2 que se divide en 9 secciones cuadradas de 1 mm^2 . Así mismo, la sección central se encuentra dividida en 25 cuadrados con líneas dobles o triples, por último cada uno de los 25 cuadrados están divididos en 16 cuadrados pequeños con un área de $1/400 \text{ mm}^2$, esto se puede apreciar detalladamente en la Figura 6.

Figura 6

Divisiones de la zona de conteo de una cámara de Neubauer.



Nota. Tomado de *Manual cell counting with Neubauer chamber* [Fotografía], por LaboratoryInfo, 2022.

Capítulo III: Metodología

Fase de Campo

Recolección del Material Vegetal

Los frutos inmaduros del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) fueron recolectados en las faldas del volcán Imbabura, cerca de la comunidad Cashaloma, Imbabura (0.267273, -78.143668). Los frutos fueron colados dentro de fundas plásticas y transportados en una hielera al Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Fase de Laboratorio

Selección del Material Vegetal

Se seleccionaron los frutos inmaduros que no presentaban heridas en la cáscara o aberturas (Figura 7A). Además, se escogieron aquellos frutos con cáscara total o parcialmente verde (Figura 7B). Por último, todos los frutos presentaron una película fina blanquecina (Figura 7C), debido a esto se limpiaron previamente con etanol al 70% y agua corriente para eliminarla.

Figura 7

Selección de los frutos inmaduros de mortiño.



Nota. A) Frutos con heridas en la cáscara o aberturas. B) Frutos con cáscara total o parcialmente verde. C) Película blanca delgada presente en los frutos recolectados.

Unidad Experimental y Condiciones de Cultivo

La unidad experimental para los procesos de desinfección e inducción a callogénesis fue un frasco de vidrio de 250 mL de capacidad conteniendo 30 mL de medio de cultivo semisólido con cuatro explantes que se incubó en oscuridad a 19 ± 2 °C. Durante el establecimiento de suspensiones celulares, se empleó como unidad experimental un matraz Erlenmeyer de 25 mL de capacidad conteniendo 15 mL de medio de cultivo líquido con aproximadamente 0.5 g de células madre, incubado con agitación constante a 120 rpm en oscuridad a 21 ± 2 °C.

Desinfección

La desinfección se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por Vargas (2021) con modificaciones, debido a la presencia de contaminación y que el material vegetal empleado se trató de hojas *ex vitro* de mortiño.

A los mortiños seleccionados se los lavó con agua corriente por 10 minutos, enseguida se colocó una solución de detergente al 2% (p/v) por 10 minutos para eliminar impurezas residuales. Posteriormente, al material vegetal se aplicó etanol al 70% (v/v) por 5 minutos; a continuación se empleó una solución fungicida de sulfato de cobre pentahidratado (Skul 27[®] Agripac S.A., Ecuador) con dos concentraciones 2% y 4% (v/v) por dos períodos de tiempo de 5 y 10 minutos, como se detalla en la Tabla 4. Para finalizar se lavaron los mortiños con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 10% (v/v) más Tween 20 por un período de 10 minutos. Después de cada lavado se enjuagó el material vegetal con agua destilada por tres ocasiones; el último enjuague se lo realizó con agua estéril dentro de una cámara de flujo laminar ESCO previamente desinfectada con etanol al 70% y esterilizada con radiación ultravioleta.

Tabla 4

Concentración de solución fungicida y tiempo de inmersión a los que se sometieron los frutos inmaduros de mortiño.

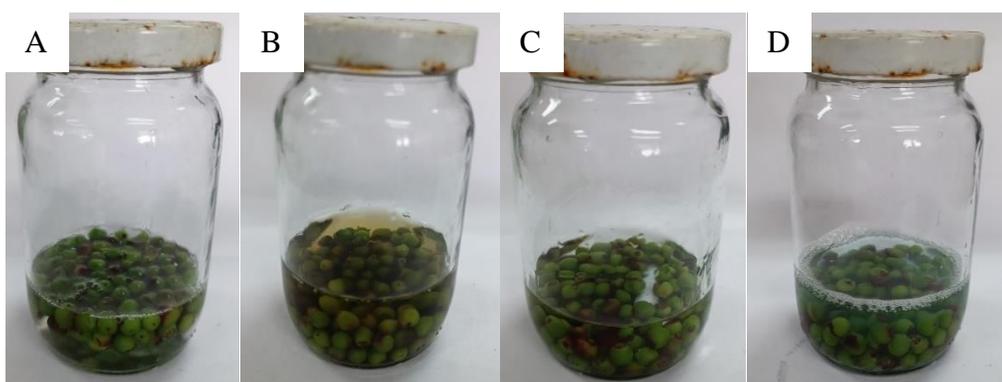
Tratamiento	Solución de fungicida (% v/v)	Tiempo de inmersión (min)
DT0 (control)	0	0
DT1	2	5
DT2	4	5
DT3	2	10
DT4	4	10

Nota. Porcentajes de la solución de fungicida y los tiempos de inmersión empleados durante el proceso de desinfección del fruto inmaduro de mortiño.

En la Figura 8 se puede observar el proceso de desinfección al que fueron sometidos los frutos inmaduros seleccionados. A los 7 y 14 días de cultivo, se evaluó el porcentaje de contaminación, considerando la presencia de bacterias u hongos.

Figura 8

Proceso de desinfección de frutos inmaduros de mortiño.



Nota. Frutos inmaduros de mortiño sumergidos en soluciones de: A) detergente al 2% (p/v), B) etanol al 70% (v/v), C) fungicida Skul 27[®] al 2% (v/v) e D) hipoclorito de sodio al 10% (v/v).

Inducción a Callogénesis

Culminado el proceso de desinfección, en la cámara de flujo laminar ESCO, los frutos fueron seccionados inferior, superior y lateralmente; a continuación se sembraron en frascos de vidrio de 250 mL de capacidad conteniendo 30 mL de medio de cultivo semisólido con sales MS o WPM, suplementados con 30 g/L de azúcar, 2 g/L de Phytigel, 2 mg/L de 6-BAP y 2,4-D a diferentes concentraciones (2.5, 3 y 4 mg/L) como se indica en la Tabla 5; los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5.7-5.8 (Vargas, 2021). Se sembró cuatro explantes por cada frasco de vidrio.

Para finalizar, los frascos de vidrio con los diferentes tratamientos fueron incubados durante 28 días en condiciones descritas previamente. Los explantes se observaron a los 7, 14, 21 y 28 días de cultivo, evaluando el porcentaje de la formación de células madre, viabilidad y oxidación/necrosamiento.

Tabla 5

Medios de cultivo y concentraciones de 2,4-D empleados en la inducción a callogénesis a partir de frutos inmaduros de mortiño.

Tratamiento	Medio de cultivo	2,4-D (mg/L)
IT1 (control)	WPM	0
IT2	WPM	2.5
IT3	WPM	3
IT4	WPM	4
IT5 (control)	MS	0
IT6	MS	2.5
IT7	MS	3
IT8	MS	4

Nota. Tratamientos empleados para la inducción a callogénesis a partir de frutos inmaduros de mortiño en dos medios de cultivo suplementados con distintas concentraciones de 2,4-D.

Establecimiento de Suspensiones Celulares

A los 56 días de cultivadas las células madre, en una cámara de flujo laminar ESCO previamente desinfectada y esterilizada, se pesó 0.5 g aproximadamente de éstas en una balanza analítica Dhaus para posteriormente disgregarlas utilizando un método mecánico. Finalmente, el material vegetal se colocó en matraces Erlenmeyer de 25 mL de capacidad conteniendo 15 mL de medio de cultivo líquido MS o WPM suplementado 40 g/L de azúcar, 2 mg/L de 6-BAP y diferentes concentraciones de 2,4-D (2.5, 3 y 4 mg/L) como se indica en la Tabla 6; los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5.7-5.8 (Verde Yañez, 2017).

Tabla 6

Medios de cultivo y concentraciones de 2,4-D empleados para la formación de suspensiones celulares a partir de células madre de mortiño.

Tratamiento	Medio de cultivo	2,4-D (mg/L)
ST1 (control)	WPM	0
ST2	WPM	2.5
ST3	WPM	3
ST4	WPM	4
ST5 (control)	MS	0
ST5	MS	2.5
ST7	MS	3
ST8	MS	4

Nota. Tratamientos empleados para la formación de suspensiones celulares a partir de células madre de mortiño en dos medios de cultivo líquidos suplementados con distintas concentraciones de 2,4-D.

Los matraces Erlenmeyer inoculados se colocaron en un agitador orbital WideSake bajo condiciones anteriormente descritas.

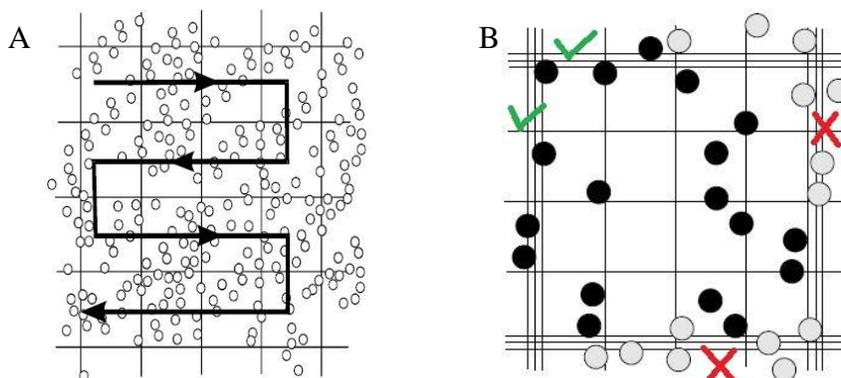
Recuento Celular a Partir de Suspensiones Celulares

Siguiendo la metodología empleada por Carrera *et al.* (2015), se tomaron muestras de 10 μL de las suspensiones celulares a los 7 y 14 días de cultivo, con una micropipeta de 2-20 μL . Las muestras se colocaron en cámaras de Neubauer y se observaron en un microscopio óptico Olympus con capturada Infinity-2 y con el aumento 40X. Se tomaron capturas de 8 cuadrados de área 0.05 mm^2 para realizar el recuento celular.

El recuento celular se realizó acorde a los establecido por García Borges (2016), los cuadrados de área 0.05 mm^2 fueron seleccionados de derecha a izquierda y de arriba hacia abajo como se ve en la Figura 9A; en los casos en que las células se encontraron sobre las líneas de división, se consideraron aquellas que estuvieron en el margen superior y/o izquierdo de cada sección como se detalla en la Figura 9B.

Figura 9

Especificaciones para el recuento celular manual en cámara de Neubauer.



Nota. A) Sentido que se debe seguir para la selección de cuadrados para evitar un doble recuento. B) Las células que se encuentran en el margen superior y/o izquierdo se consideran para el recuento de cada sección. Tomado de *Manual cell counting with Neubauer chamber* [Fotografía], por LaboratoryInfo, 2022.

Al terminar el recuento celular, se empleó la Ecuación 1 para calcular el número de células por mililitro (Carrera *et al.*, 2015).

$$\text{Concentración celular} \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Núm. de células} \times 10000}{\text{Núm. de cuadrados contabilizados}} \quad (1)$$

Análisis de Datos

Para el análisis de datos se usó el software InfoStat (ver. 2018I). En cada etapa se empleó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado para determinar si los datos obtenidos siguen una distribución normal. Cuando datos mostraron una distribución normal ($p - \text{valor} > 0.05$) se los procesó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) a través de la prueba de Duncan para comparar los tratamientos y determinar el tratamiento con mejores resultados.

Para los datos que no siguen una distribución normal ($p - \text{valor} < 0.05$), se aplicó un ANOVA no paramétrico por medio de la prueba de Kruskal-Wallis para determinar el mejor tratamiento al comparar sus medianas. Para todas las pruebas estadísticas se empleó un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Capítulo IV: Resultados

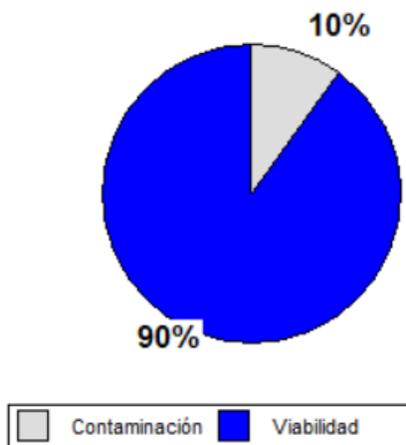
Desinfección

El tratamiento con mejores resultados para la desinfección de frutos inmaduros de mortiño fue el DT3, que consiste en lavados con agua corriente por 10 min, solución de detergente al 2% (p/v) por 10 min, etanol al 70% (v/v) por 5 min, solución de fungicida al 2% por 10 min y solución de hipoclorito de sodio al 10% más Tween 20 por 10 min.

El tratamiento DT3 mostró una viabilidad del 90% en los explantes introducidos y una contaminación del 10%, como se muestra en la Figura 10.

Figura 10

Porcentajes de viabilidad y contaminación en el tratamiento DT3.



Porcentajes de Contaminación

Las medias de los porcentajes de contaminación para los diferentes tratamientos aplicados se pueden apreciar en la Tabla 7. Se observó que los tratamientos DT1, DT3 y DT4 arrojaron los menores porcentajes de contaminación (9.17%, 7.50% y 6.67%, respectivamente) a los 7 días de cultivo como se observa en la Figura 11A. Sin embargo, en la Figura 11B se muestra que a los 14 días de cultivo la contaminación en los explantes introducidos aumentó,

siendo los tratamientos DT3 y DT4 los que presentaron menores porcentajes de contaminación (10.0% y 11.67%, respectivamente).

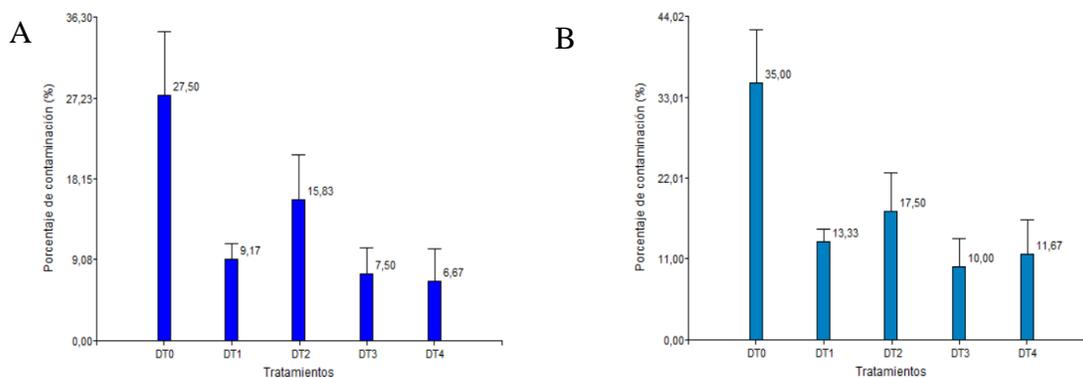
Tabla 7

Porcentajes de contaminación en explantes introducidos según el tratamiento empleado.

Tratamiento	Media de contaminación (%)	
	Día 7	Día 14
DT0 (control)	27.50	35.00
DT1	9.17	13.33
DT2	15.83	17.50
DT3	7.50	10.00
DT4	6.67	11.67

Figura 11

Porcentajes de contaminación obtenidos con los diferentes tratamientos durante la desinfección de frutos inmaduros de mortiño.



Nota. Porcentajes de contaminación obtenidos a los A) 7 y B) 14 días de cultivo.

Comparación de los Tratamientos

Al aplicar la prueba de Shapiro-Wilks modificado para las medias del porcentaje de contaminación durante los 7 y 14 días de cultivo, se obtuvo que los datos siguen una

distribución normal ya que sus p-valor son mayores al nivel de significancia (p – *valor* de 0.0684 y 0.1513, respectivamente), como se detalla en la Tabla 8.

Tabla 8

Prueba de Shapiro-Wilks modificado para los resultados obtenidos de los porcentajes de contaminación.

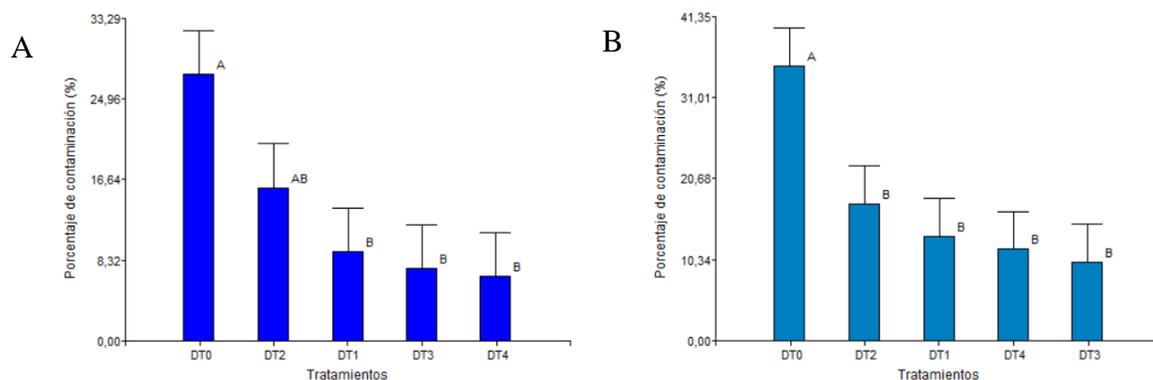
Tiempo de cultivo	p-valor (Unilateral D)
7 días	0.0684
14 días	0.1513

Nota. Los p-valor obtenidos son mayores al nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), lo que indica una distribución normal de los datos.

Con la prueba de Duncan se comparó las medias del porcentaje de contaminación, obteniendo dos grupos: “A” y “B”, lo que indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos (Figura 12). Al séptimo día de cultivo se observa que los tratamientos DT1, DT3 y DT4 presentan los menores porcentajes de contaminación, por lo tanto son estadísticamente iguales (Figura 12A), siendo el mejor tratamiento el DT4 ya que muestra un 6.67% de contaminación (Figura 11A). A los 14 días de cultivo, los tratamientos DT1, DT2, DT3 y DT4 son estadísticamente similares (Figura 12B); pero el tratamiento DT3 tiene el menor porcentaje de contaminación (10.00%) como se observa en la Figura 11B.

Figura 12

Comparación de medias de los porcentajes de contaminación – Prueba de Duncan.

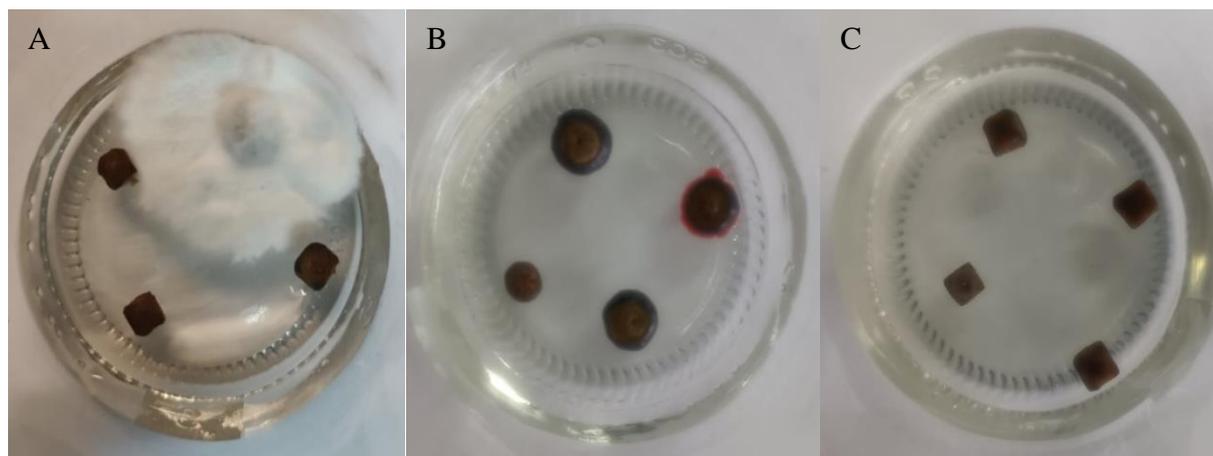


Nota. Resultados de la prueba de Duncan a los A) 7 y B) 14 días de cultivo.

Con los diferentes tratamientos de desinfección se observó únicamente contaminación por hongos como se muestra en la Figura 13A. Sin embargo, en la Figura 13B se muestra que algunos explantes introducidos presentaron contaminación por bacterias de coloración roja. También se obtuvo explantes sin contaminación (Figura 13C).

Figura 13

Frutos inmaduros de mortiño contaminados y no contaminados.



Nota. A) Contaminación por hongos, B) contaminación por bacteria y C) sin contaminación.

Inducción a Callogénesis

El tratamiento con mejores resultados para la inducción a callogénesis es el IT4, que se trató de medio de cultivo semisólido WPM suplementado con 2 mg/L de 6-BAP y 4 mg/L de 2,4-D, con un porcentaje de formación de células madre del 81.67%.

Porcentajes de Inducción

En la Tabla 9 se muestran las medias de los porcentajes de inducción obtenidos con los diferentes tratamientos a los 28 días de cultivo; los tratamientos en los que se emplearon los reguladores de crecimiento presentaron formación de células madre en diferentes porcentajes, sin embargo en los tratamientos control (IT1 e IT5) no se obtuvo células madre. El tratamiento con el mayor porcentaje de inducción es IT4 con un 81.67% de formación de células madre, seguido por el tratamiento IT3 con 51.67%, como se muestra en las Figura 14.

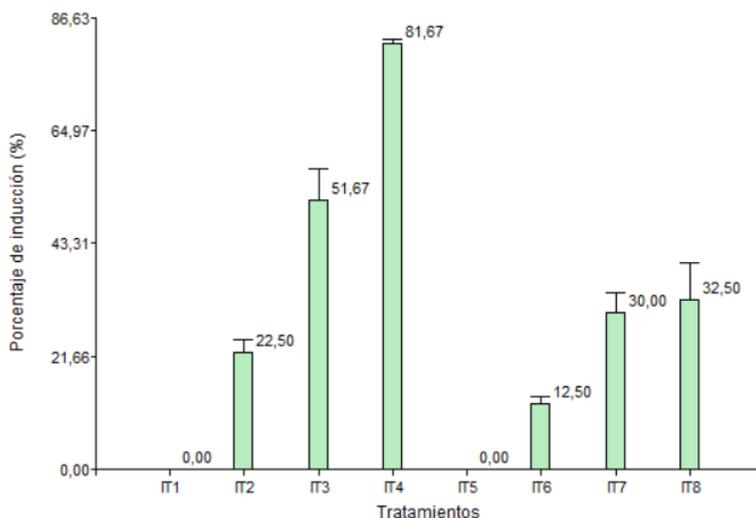
Tabla 9

Porcentajes de inducción obtenidos a los 28 días de cultivo.

Tratamiento	Porcentaje de inducción (%)
IT1 (control)	0.00
IT2	22.50
IT3	51.67
IT4	81.67
IT5 (control)	0.00
IT6	12.50
IT7	30.00
IT8	32.50

Figura 14

Porcentaje de inducción a células madre en frutos inmaduros de mortiño a los 28 días de cultivo.



Comparación de los Tratamientos

Mediante la prueba de Shapiro-Wilks modificado aplicada a las medias de los porcentajes de inducción se obtuvo que los datos no siguen una distribución normal debido que el p-valor es menor al nivel de significancia ($p - valor < 0.0001$) como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10

Prueba de Shapiro-Wilks modificado para los resultados obtenidos de los porcentajes de inducción a callogénesis.

Tiempo de cultivo	p-valor (Unilateral D)
28 días	<0.0001

Nota. El p-valor obtenido es menor al nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), lo que indica que los datos no tienen una distribución normal.

Debido a que los datos no siguen una distribución normal se aplicó la prueba ANOVA de Kruskal-Wallis, al comparar la medianas a los 28 días de cultivo se obtuvo que los tratamientos siguen diferentes distribuciones ya que el p-valor es menor al nivel de significancia, lo que indica que son estadísticamente distintos entre ellos (Tabla 11). Sin considerar los tratamientos control (IT1 e IT5), se puede apreciar la formación de células madre a partir de los 21 días de cultivo.

Tabla 11

Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para los datos de inducción a callogénesis a los 28 días de cultivo.

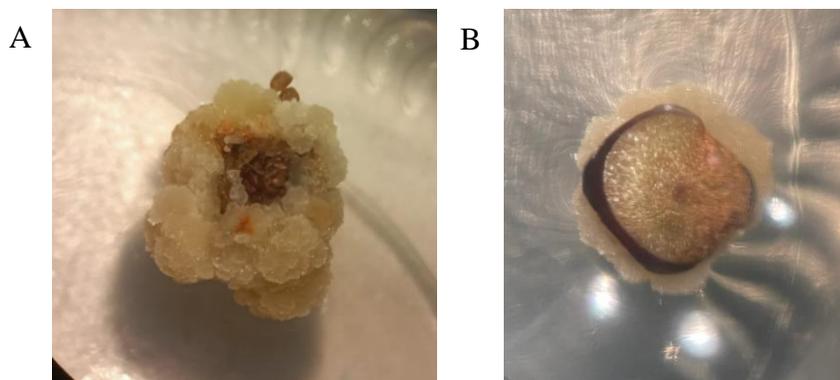
Tratamientos	Medias de inducción (%)	Medianas de inducción (%)	p-valor
IT1 (control)	0.00	0.00	0.0028
IT2	22.50	25.00	
IT3	51.67	55.00	
IT4	81.67	82.50	
IT5 (control)	0.00	0.00	
IT6	12.50	12.50	
IT7	30.00	32.50	
IT8	32.50	32.50	

En esta etapa, se observó la formación de células madre de frutos inmaduros de mortiño como se indica en la Figura 15. En general, los explantes sembrados en medio de cultivo semisólido WPM con 2,4-D y 6-BAP, presentaron un mayor desarrollo de células madre (Figura 15A). Aquellos explantes sembrados en medio de cultivo semisólido MS con 2,4-D y 6-BAP, mostraron una baja formación y lento desarrollo de células madre (Figura 15B).

El tipo de medio de cultivo semisólido empleado durante la inducción a callogénesis no influyó en las características morfológicas de las células madre (Figura 15).

Figura 15

Formación de células madre de mortiño en medio de cultivo semisólido con 2,4-D y 6-BAP.



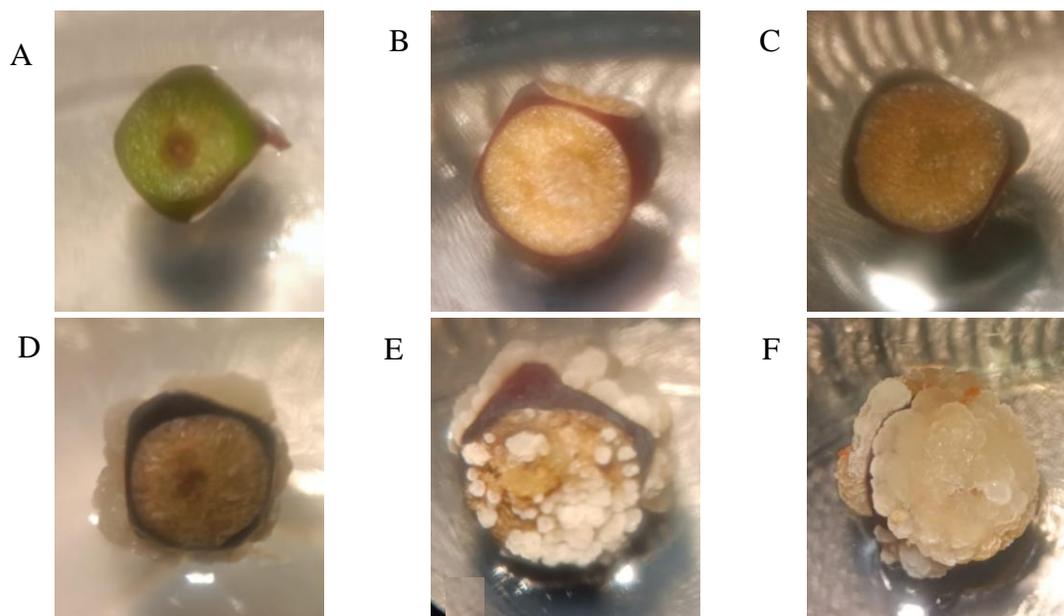
Nota. Células madre de mortiño desarrolladas en medio de cultivo semisólido A) WPM y B) MS suplementados con 2,4-D y 6-BAP.

Cambio Morfológicos Durante la Inducción a Callogénesis

En la Figura 16 se muestran los cambios morfológicos que se dieron en los explantes sembrados, aplicando el tratamiento IT4, a los 1, 7, 14, 21, 28 y 56 días de cultivo. En el primer día de cultivo (día de siembra) se observa al explante de color verde (Figura 16A); mientras tanto al séptimo día de cultivo se evidencia oxidación (oscurecimiento) en el explante (Figura 16B). El explante, en el día 14 de cultivo, muestra una mayor oxidación y ensanchamiento (Figura 16C); sin embargo, al vigésimo primer día de cultivo se empieza a observar la formación de células madre de coloración blanca/beige (Figura 16D). El explante presenta una mayor cantidad de células madre a los 28 días de cultivo (Figura 16E). Finalmente, en el día 56 de cultivo se presenta al explante cubierto por células madre, algunas con ligera coloración naranja/café en pequeñas porciones (Figura 16F).

Figura 16

Cambios morfológicos en frutos inmaduros de mortiño durante la inducción a callogénesis en un período de 56 días de cultivo.



Nota. Proceso de desdiferenciación en fruto inmaduro de mortiño. A) Explante en el día uno de cultivo. B) El explante a los 7 días de cultivo muestra oscurecimiento. C) A los 14 días de cultivo se evidencia una mayor oxidación y un ensanchamiento del explante. D) Con 21 de cultivo comienza a evidenciarse la formación de células madre. E) El explante con 28 días de cultivo presenta más células madre. F) A los 56 días de cultivo, el explante se encuentra cubierto por células madre.

Oxidación y Viabilidad

En el tratamiento IT4 se observó que los explantes sembrados primero se oxidaron, es decir que se oscurecieron, antes de llegar a formar células madre. Esta oxidación no afectó a la viabilidad de los explantes. Esto se puede evidenciar en la Figura 16B-16F, donde se observa el cambio de coloración en los explantes y posterior aparición de células madre.

Establecimiento de Suspensiones Celulares

El tratamiento con una mayor concentración celular fue ST8 con 83729 células/mL, en este tratamiento se empleó medio de cultivo líquido MS suplementado con 2 mg/L de 6-BAP y 4 mg/L de 2,4-D.

Recuento Celular

El recuento celular se realizó a los 7 y 14 días de cultivo en los medios de cultivo líquidos de los distintos tratamientos. Las medias del recuento celular se detallan en la Tabla 12. Todos los tratamientos mostraron crecimiento celular, incluyendo los tratamientos control (ST1 y ST5) a pesar de no contar con reguladores de crecimiento (Figura 17).

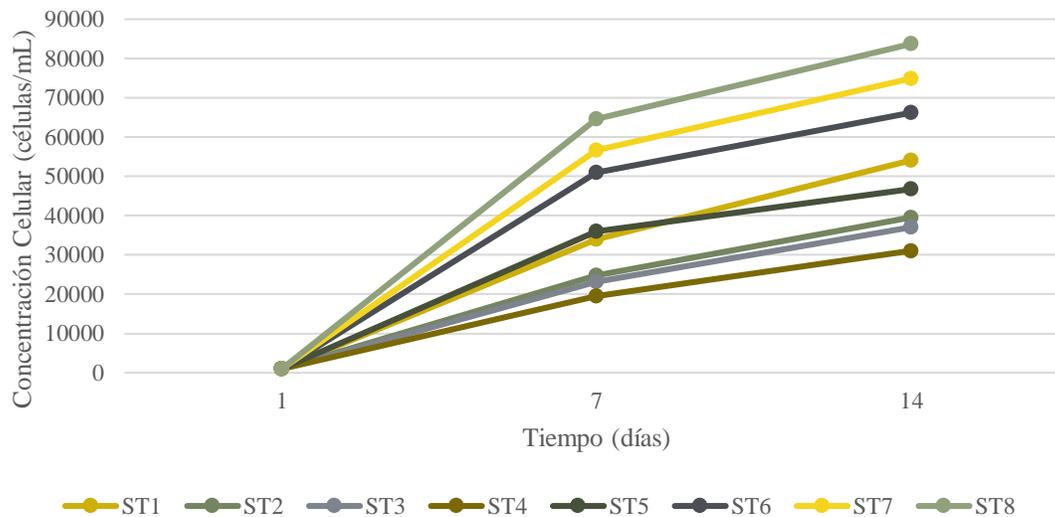
Tabla 12

Resultados del recuento celular de los tratamientos aplicados.

Tratamiento	Concentración celular (células/mL)	
	Día 7	Día 14
ST1 (control)	33958	54104
ST2	24813	39563
ST3	23208	37063
ST4	19479	31063
ST5 (control)	36000	46771
ST6	50938	66208
ST7	56667	74938
ST8	64563	83729

Figura 17

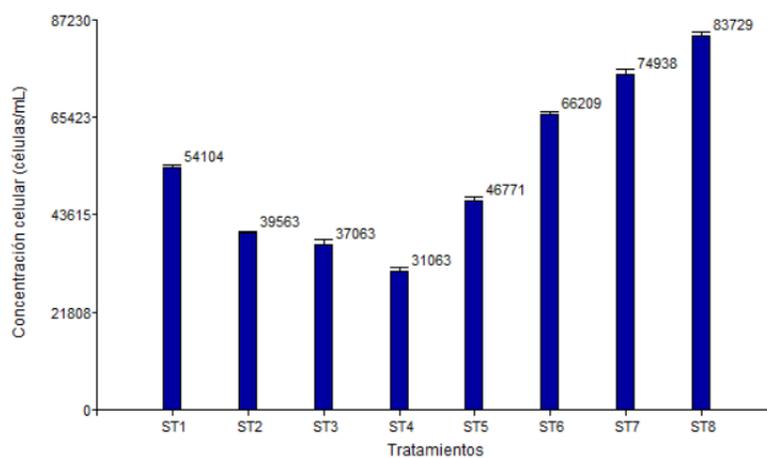
Crecimiento celular observado durante el período de cultivo.



A los 14 días de cultivo, el tratamiento que presentó una mayor concentración celular fue el tratamiento ST8 (83729 células/mL), además el tratamiento ST7 también presentó una alta concentración celular (74938 células/mL); como se indica en la Figura 18.

Figura 18

Medias del recuento celular de suspensiones celulares de mortiño a los 14 días de cultivo.



Comparación de los Tratamientos

Con la prueba de Shapiro-Wilks modificado se observó que los datos obtenidos del recuento celular a los 14 días de cultivo no siguen una distribución normal considerando que su p-valor está por debajo del nivel de significancia ($p - valor < 0.0001$) tal como se aprecia en la Tabla 13.

Tabla 13

Prueba de Shapiro-Wilks modificado para los resultados obtenidos del recuento celular.

Tiempo de cultivo	p-valor (Unilateral D)
14 días	<0.0001

Nota. El p-valor obtenido es mayor al nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), por lo tanto, los datos no siguen una distribución normal.

Considerando que los datos no siguen una distribución, se realizó un ANOVA de Kruskal-Wallis, para comparar los resultados de la concentración celular a los 14 días de cultivo. La comparación mostró que los tratamientos siguen distribuciones distintas porque el p-valor fue menor al nivel de significancia. Por lo tanto, los tratamientos son estadísticamente distintos entre ellos (Tabla 14).

Tabla 14

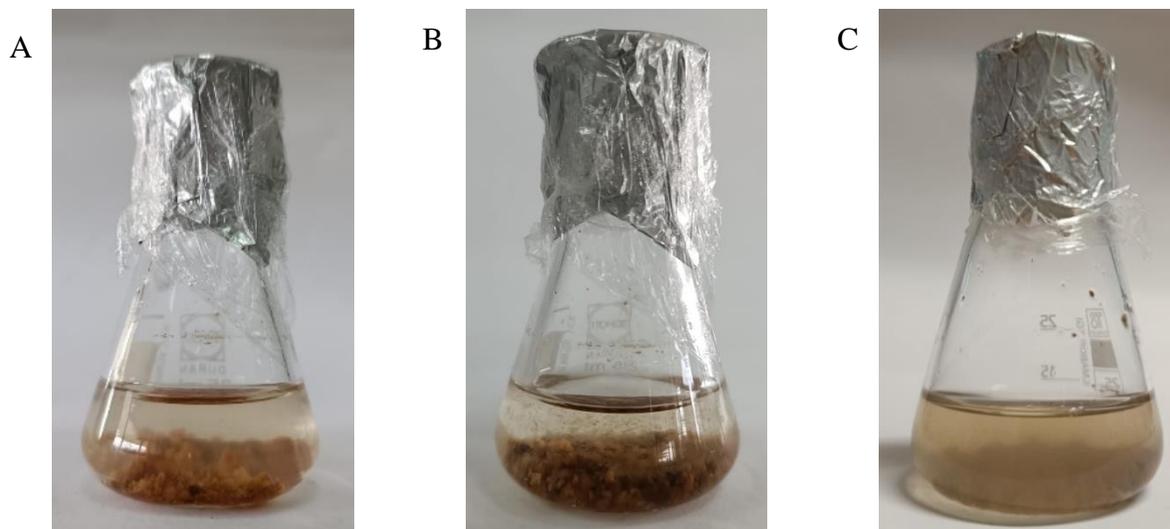
Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para los datos de concentración celular a los 14 días de cultivo.

Tratamientos	Medias de concentración celular (células/mL)	Medianas de concentración celular (células/mL)	p-valor
ST1 (control)	54104	54375	<0.0001
ST2	39563	40000	
ST3	37063	38125	
ST4	31063	30313	
ST5 (control)	46771	45625	
ST6	66209	66563	
ST7	74938	74375	
ST8	83729	84063	

Durante esta etapa, se logró establecer suspensiones celulares a partir de células madre de mortño en todos los tratamientos, esto se evidenció con el recuento celular realizado en cámara de Neubauer. Además, el crecimiento celular también se puede apreciar por observación de los matraces Erlenmeyer, ya que el medio de cultivo líquido se fue tornando cada vez más turbio (Figura 19).

Figura 19

Aumento de la turbidez del medio de cultivo líquido en matraces inoculados.



Nota. Turbidez observada en el medio de cultivo líquido del tratamiento ST8 a A) 1, B) 7 y C) 14 días de cultivo.

Capítulo V: Discusión

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) posee un alto potencial de aplicación gracias a varias de sus propiedades como antioxidantes, antimicrobiano, regeneración de suelos, entre otros (Coba Santamaría *et al.*, 2012). Además, se trata de una especie que presenta una baja tasa de domesticación debido a su lento crecimiento (2 cm/mes o menos), disminuyendo en gran medida su interés comercial (Llvisaca-Contreras *et al.*, 2022). Sin embargo los ecosistemas en que se encuentra se ven afectados por la explotación en aumento de sus frutos, los cuales son usados para la preparación de bebidas tradicionales y también infusiones para el tratamiento de reumatismo, además se los emplea para la producción de tintes (Muñoz & Caviedes, 2011).

Con el establecimiento de suspensiones a partir de células madre de mortiño se puede obtener metabolitos secundarios de intereses que pueden ser aprovechados para el desarrollo de nuevas investigaciones o a nivel comercial para el aprovechamiento de sus propiedades en la fabricación de nuevos productos. Esto lograría reducir el impacto negativo en los ecosistemas donde se encuentra naturalmente el mortiño.

Desinfección

El en cultivo de tejidos vegetales *in vitro* el proceso de desinfección de los explantes es crucial para lograr la correcta eliminación de agentes contaminantes como bacterias y hongos ya que afectan en su establecimiento *in vitro*, además que pueden afectar en la conservación de germoplasma (Lazo-Javalera *et al.*, 2016).

En este proyecto se emplearon distintos tratamientos con variaciones en la concentración de solución fungicida y diferentes tiempos de inmersión. El tratamiento DT3 fue el que tuvo mejores resultados, mostrando explantes con un 10% de contaminación. Este tratamiento consistió en una serie de lavados con agua corriente por 10 minutos, solución de

detergente al 2% (p/v) por 10 minutos, etanol al 70% por 5 minutos, solución fungicida al 2% por 10 minutos y solución de hipoclorito de sodio al 10% más Tween 20 por 10 minutos.

Durante ensayos preliminares se determinó una alta contaminación fúngica (>85%) empleando el protocolo establecido por Vargas (2021), quién obtuvo un 38.52% de contaminación en explantes introducidos a partir de hojas de *V. floribundum* Kunth. Debido a esto, se realizó modificaciones aumentando el porcentaje de hipoclorito de sodio hasta un 10% y el tiempo de inmersión a 10 minutos, para lograr disminuir la permanencia de hongos en los frutos inmaduros. El hipoclorito de sodio tiene la capacidad de degradar enzimas lo que favorece a la destrucción de microorganismos como bacterias y hongos, además por la formación de cloraminas es capaz de interferir en el metabolismo celular (El Sayed *et al.*, 2021).

En el estudio realizado por Dueñas (2017) se obtuvo que el mejor tratamiento para la desinfección de brotes de *V. floribundum* Kunth. consistió en lavados con agua corriente, etanol al 70% por un minuto e hipoclorito de sodio al 2% por 20 minutos; obteniendo una contaminación del 30%, causada principalmente por hongos. Mientras tanto en este estudio se logró un menor porcentaje de contaminación en los explantes introducidos, además se observó contaminación únicamente por hongos (Figura 11A). La contaminación bacteriana observada (Figura 11B) se determinó que proviene del operador por su coloración roja característica, esto se debe a un mal manejo de los materiales durante el trabajo realizado en cámara de flujo laminar (Baracaldo, 2018).

Torres *et al.*, (2010) estableció yemas axilares de *V. meridionale* Sw. aplicando un proceso de desinfección que consistió en lavados con etanol al 70% por tres minutos, hipoclorito de sodio al 2.5% más 3-4 gotas de Tween 20 por 10-12 minutos, consiguiendo un 40% de contaminación en los explantes introducidos; por lo que se consideró que el tratamiento

de desinfección aplicado en los tallos no logró erradicar por completó los agentes contaminantes. Estos altos porcentajes de contaminación se pueden deber a que los explantes empleados en todos los estudios mencionados provienen de plantas silvestres, lo que dificulta llevar a cabo un control fitosanitario (Tetsumura *et al.*, 2008). Sin embargo, en el presente estudio se logró obtener un bajo porcentaje de contaminación a pesar de emplear frutos inmaduros de plantas silvestres sin un control fitosanitario previo.

Inducción a Callogénesis

Para la inducción a callo en muchos casos es necesario emplear una combinación de auxina:citoquinina, por lo general con una mayor concentración de auxinas, ya que esto favorece la formación de células madre en explantes juveniles como frutos inmaduros (Rodríguez *et al.*, 2014); por ello en este proyecto se empleó una combinación de 2,4-D y 6-BAP para el proceso de inducción a callogénesis.

Con los tratamientos aplicados se logró inducir la formación de células madre, exceptuando los controles (IT1 e IT5) ya que no contaban con los reguladores de crecimiento, siendo evidente que es necesario su uso para favorecer la inducción aprovechando además el estrés al que se someten los explantes al ser seccionados. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Vargas (2021) y Maila (2022), ya que con sus tratamientos control donde no se emplearon reguladores de crecimiento no se obtuvo la formación de células madre, empleando como material vegetal hojas de *V. floribundum* Kunth. y frutos inmaduros de *Hyeronima macrocarpa* Schltr., respectivamente.

El mejor tratamiento fue el IT4, que consiste en medio de cultivo semisólido WPM con 4 mg de 2,4-D y 2 mg de 6-BAP, con el cual se logró un 81.67% de inducción a callogénesis a los 27 días de cultivo. La proporción auxina:citoquinina empleada en este tratamiento fue de 2:1, esto se diferencia del proyecto realizado por Maila (2022) donde el mejor tratamiento para la

formación de células madre de mesocarpio inmaduros de *H. macrocarpa* Schltr. fue de 4 mg de 2,4-D y 1 mg de 6-BAP en medio de cultivo WPM, siendo una proporción 4:1 de auxina:citoquinina.

Además, Vargas (2021) demostró que al usar únicamente 2,4-D como regulador de crecimiento se puede obtener células madre en hojas de *V. floribundum* Kunth. Sin embargo, mediante pruebas piloto no reportadas, se evidenció que usar solamente 2,4-D como regulador de crecimiento no inició el proceso de desdiferenciación celular en los frutos inmaduros de mortiño empleados en el presente proyecto; siendo necesario emplear una combinación de auxina y citoquinina para la inducción a callogénesis, lo que concuerda con lo reportado por Torres *et al.* (2010), donde se empleó 6-BAP y ANA para la formación de células madre a partir de brotes de *V. floribundum* Kunth.

Otro aspecto considerado fue la oxidación en los explantes sembrados, con el tratamiento IT4 se obtuvo explantes totalmente oxidados cubiertos por células madre a los 56 días de cultivo. Mientras tanto, en el estudio realizado por Dueñas (2017) no se logró inducir la callogénesis en hojas de *V. floribundum* Kunth., donde se observó que la oxidación del material vegetal impidió la callogénesis porque los explantes llegaban al necrosamiento (muerte).

En general, la oxidación (oscurecimiento) del material vegetal se debe al proceso de desinfección, esto se trata de evitar debido a que en la mayoría de los casos produce el necrosamiento de los explantes, por lo cual se emplean reactivos antioxidantes como el ácido cítrico para evitar la oxidación (Azofeifa, 2009). Sin embargo, para este proyecto se determinó que la oxidación no influye negativamente en la viabilidad de los explantes, por lo tanto se considera que es un paso por el cual los explantes deben pasar para la formación de células madre.

Establecimiento de Suspensiones Celulares

Para el establecimiento de suspensiones celulares, a diferencia de la inducción a callogénesis, el uso de reguladores de crecimiento no es indispensable para producir un crecimiento celular estable (García Borges, 2016). Como se observó en la presente investigación, los tratamientos control ST1 y ST5 produjeron un mejor crecimiento celular que los tratamientos ST2, ST3 y ST4, los cuales contaban con reguladores de crecimiento (Figura 18).

Suplementar el medio de cultivo líquido puede favorecer el crecimiento celular, logrando aumentar la concentración celular rápidamente en poco tiempo como se observó con el tratamiento ST4 (Figura 19) que contenía 4 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de 6-BAP. Carrera *et al.* (2015), emplearon medios de cultivo líquido con 2.5, 2 y 1.5 mg/L de 2,4-D para el establecimiento de suspensiones de cultivos de *Valeriana pyramidalis* Kunth., observando que el tratamiento con la mayor concentración del regulador de crecimiento logró una mejor respuesta para el crecimiento celular.

Sin embargo, adicionar reguladores de crecimiento no asegura lograr un eficaz aumento en la concentración celular. Para los tratamientos con medio de cultivo WPM (ST1, ST2, ST3 y ST4), el uso de reguladores de crecimiento afectó negativamente al crecimiento celular, ya que conforme aumentaba la concentración 2,4-D menor fue la concentración celular a los 14 días de cultivo. Con los tratamientos con medio de cultivo MS (ST5, ST6, ST7 y ST8) se evidenció lo contrario, al aumentar la concentración de 2,4-D se observó mejores respuestas en el crecimiento celular, siendo que el tratamiento con la mayor concentración de 2,4-D (4 mg/L) arrojó la mejor concentración celular (83729 células/mL) a los 14 días de cultivo.

La diferencia en el uso del medio de cultivo WPM y MS para el establecimiento de suspensiones celulares de mortiño se podría explicar por las composiciones de cada medio de

cultivo. El medio de cultivo MS se trata de un medio de cultivo más completo debido a que posee mayor cantidad de compuestos. Esto es lo que pudo haber facilitado la adaptación de las células madre al ser inoculadas en el medio de cultivo líquido, reduciendo el tiempo de la fase de latencia (Narayani *et al.*, 2017).

Según Scarpa *et al.* (2022), para la producción de metabolitos secundarios con alta calidad y concentración se busca que las suspensiones celulares alcancen la fase estacionaria en la cinética de crecimiento. Durante esta fase se produce un agotamiento de los nutrientes y la concentración de productos tóxicos incrementa, estas condiciones provocan estrés en las células lo cual promueve la producción de metabolitos secundarios ya que se tratan de sustancias especializadas para combatir el estrés ambiental (Kumari Meena, 2019). Las concentraciones celulares mostradas por el tratamiento ST8 a los 7 y 14 días de cultivo (64563 y 83729 células/mL, respectivamente) aparentan corresponder a la fase exponencial debido al rápido incremento en la concentración celular, por lo tanto la producción de metabolitos secundarios podría ser baja.

Capítulo VI: Conclusiones

- El mejor tratamiento para la desinfección de frutos inmaduros de mortiño consiste en lavados con agua corriente por 10 min, solución de detergente al 2% (p/v) por 10 minutos, etanol al 70% (v/v) por cinco minutos, solución de fungicida de sulfato de cobre pentahidratado (Skul 27[®]) al 2% (v/v) por 10 minutos y solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v) más Tween 20 por 10 minutos (tratamiento DT3), con el que se consiguió un 90% de desinfección.
- Durante la inducción a callogénesis de frutos inmaduros de mortiño se determinó que el mejor tratamiento consiste un medio de cultivo semisólido WPM suplementado con 4 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de 6-BAP (tratamiento IT4), logrando un porcentaje de inducción del 81.67% de los explantes sembrados.
- El tratamiento ST8 fue el mejor para el establecimiento de suspensiones celulares a partir de células madre de mortiño, con una concentración celular de 83729 células/mL. Dicho tratamiento consiste en medio de cultivo líquido MS suplementado con 4 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de 6-BAP.

Capítulo VII: Recomendaciones

- El material vegetal que haya sido seleccionado puede ser almacenado dentro de un recipiente hermético en refrigeración (4 °C) por hasta dos semanas. Superado este tiempo los frutos comienzan un proceso de deshidratación, además empiezan a proliferar hongos debido a que se trata de material vegetal silvestre, por lo que se recomienda investigar otros métodos de almacenamiento que pueda prolongar la vida útil del material vegetal.
- En la etapa de desinfección se podría experimentar el uso de otros agentes desinfectantes como el hipoclorito de calcio, Benomyl, Ferbán, cloruro de mercurio; lo cuales se han reportado en investigaciones de otras especies del género *Vaccinium*.
- Para la inducción a callogénesis se podría plantear una nueva investigación en la que se apliquen fotoperíodos para determinar si la influencia de la luz afecta positiva o negativamente en la formación de células madre.
- Es recomendable aprovechar las suspensiones celulares establecidas para un estudio sobre la producción de metabolitos secundarios, ya que se sabe que el fruto del mortiño posee compuestos de interés como proantocianidinas, antocianinas, fenoles y flavonoides.

Bibliografía

- Angel, J. G. (1 de Septiembre de 2014). *Agraz Silvestre o Mortiño, Cómo se cosecha [Fotografía]*. Obtenido de Youtube:
https://www.youtube.com/watch?v=Z0kaDQylvVA&t=1s&ab_channel=TvAgro
- Azofeifa, Á. (2009). Problema de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20, 153-175. <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Baracaldo, C. (2018). *Estandarización de un medio de cultivo para la obtención de plántulas a partir del cultivo in-vitro de meristemos de Solanum phureja - Mutante Flor Blanca [Tesis de Pregrado, Universidad Distrital Francisco José de Caldas]*. Repositorio Institucional. Obtenido de
<https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/14947/BaracaldoHuertasCindyLorena2018.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Blanco, P., & del Valle, A. (2009). *Herbarium Mutisianum*. Madrid: CSIC. Obtenido de
<https://www.digitaliapublishing.com/a/13420>
- Carrera, E., Peña, C., & Jadán, M. (2015). Esblecimiento de suspensiones celulares a partir de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth. *Revista Científica Ecuatoriana*.
<https://doi.org/10.36331/revista.v2i1.7>
- Castillo, M., & de Janon, M. (2018). *Caracterización y microencapsulación de compuestos bioactivos del motiño (Vaccinium floribundum Kunth), en la Sierra Norte del Ecuador [Tesis de Pregrado, Universidad de las Américas]*. Repositorio institucional. Obtenido de
<https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/10240/1/UDLA-EC-TIAG-2018-38.pdf>

Cetim, E. S., Bablik, Z., Hallac-Turk, F., & Gokturk-Baydar, N. (2014). The effects of cadmium chloride on secondary metabolite production in *Vitis vinifera* cv. cell suspension cultures. *Biological Research*. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-47>

Chawla, H. (2002). *Introduction to plant biotechnology*. USA: Science Publishers Inc. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=RgQLISN8zT8C&printsec=frontcover&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

Coba Santamaría, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M. F., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimentos funcional. *La Granja*, 16(2), 5-13. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476047400002>

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

Dueñas, F. (2017). *Establecimiento in vitro del frutal andino mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) para la aplicación de agrotecnologías de multiplicación acelerada [Tesis de Pregrado, Universidad de las Américas]*. Repositorio institucional. Obtenido de <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/8715/4/UDLA-EC-TIAG-2017-42.pdf>

El Sayed, M., Ghanerad, N., Shabanpour, Z., Shabanpoor, M., & Rahimi, F. (2021). Comparing the Antifungal Effect of Sodium Hypochlorite Gel versus Different Types of Root Canal Medicaments at Different Time Intervals Using the Agar Diffusion Test: An In Vitro Study. *Int J Dent*. <https://doi.org/10.1155/2021/6550054>

Endress, R. (1994). *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag.

- García Borges, A. (2016). *Inducción y cultivo de células en suspensión de Daucus carota*. [Tesis de Pregrado, Universidad de la Laguna]. Repositorio Institucional. Obtenido de <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/3122/Induccion+y+cultivo+de+celulas+en+suspension+de+Daucus+carota.pdf;jsessionid=340AFB6DC6B82FBA459FFD56E382D6A2?sequence=1>
- Gómez, K. (1998). Cultivo de células y tejidos. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, 25-44.
- Greer, J. P., Foerster, J., Rodgers, G. M., Paraskevas, F., Glader, B., Arber, D. A., & Means, R. T. (2009). *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Idrovo, V. (2013). *Investigación del mortíño, beneficios nutricionales y su aplicación a la repostería* [Tesis de Pregrado, Universidad Tecnológica Equinoccial]. Repositorio institucional. Obtenido de http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11803/1/53331_1.pdf
- Kumari Meena, S. (2019). *Microbial Physiology*. MJP Publishers.
- LaboratoryInfo. (7 de Marzo de 2022). *Manual cell counting with Neubauer chamber* [Fotografía]. Obtenido de LaboratoryInfo: <https://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>
- Lazo-Javalera, M., Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernández, M., Martínez-Tellez, M., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M., & Rivera-Domínguez, M. (2016). Surface disinfection procedure and in vitro regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. *SpringerPlus*. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2081-0>

- Li, J., Deng, R., Hua, X., Zhang, L., Lu, F., Coursey, T. G., . . . Li, D. Q. (2016). Blueberry component pterostilbene protects corneal epithelial cells from inflammation via anti-oxidative pathway. *Scientific Report*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep19408>
- Llvisaca-Contreras, S. A., Tamariz, F. L., Manzano Santana, P., Ruales, J., Naranjo-Morán, J., Serrano-Mena, L., . . . Cevallos-Cevallos, J. M. (2022). Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth): An Underutilized Superplant from the Andes. *Horticulture*, 8(358). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050358>
- Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int. Plant Propagators Soc. Comb. Proc.*, 421-427.
- López, J. L. (2019). *Producción de compuestos con actividad antiinflamatoria y citotóxica a partir de células transformadas en suspensión de Lopezia racemosa Cav. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de Morelos]*. Repositorio institucional. Obtenido de <http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/676/LOALNS02T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Maila, A. (2022). *Evaluación del efecto del manitol y el ácido jasmónico sobre la concentración de antocianinas en callo in vitro obtenido a partir de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.) [Tesis de Pregrado, Universidad de la Fuerzas Armadas]*. Repositorio Institucional. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/32986/1/T-ESPE-052538.pdf>
- Muñoz, V., & Caviedes, M. (2011). *Determinación de métodos para producción del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), con fines de propagación y producción comercial [Tesis*

de Pregrado, Universidad San Francisco de Quito]. Repositorio Institucional. Obtenido de repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/864

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Narayani, M., Chadha, A., & Srivastava, S. (2017). Callus and cell suspension culture of *Viola odorata* as in vitro production platforms of known and novel cyclotides. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 289-299. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1223-6>

NCBI. (24 de Diciembre de 2022). 6-Benzylaminopurine [Imagen]. Obtenido de PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-Benzylaminopurine>

Özkul, M., Özel, Ç., Yüzbaşıoğlu, D., & Ünal, F. (2016). Does 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induce genotoxic effects in tissue cultured *Allium* roots? *Cytotechnology*, 68(6), 2395-2405. <https://doi.org/10.1007/s10616-016-9956-3>

Pérez, J. (2018). *Aclimatación y evaluación de planta in vitro del cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV - enano' (Musa spp., grupo AAB) en finca de producción [Tesis de Maestría, Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas]*. Repositorio institucional. Obtenido de <https://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/10771/Tesis%20MSc%20Jose%20E%20Perez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Recto, L. (2018). *Micropropagación de plántulas de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) bajo condiciones in vitro [Tesis de Pregrado, Universidad de las Américas]*. Repositorio institucional. Obtenido de <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/10389/1/UDLA-EC-TIAG-2018-53.pdf>

- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Cali: CIAT.
- Rodríguez, M. (Julio de 2018). *Cultivo In Vitro: Alternativa al Cultivo Tradicional de Plantas Medicinales [Tesis de Pregrado, Universidad Complutense]*. Repositorio institucional. Obtenido de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MIGUEL%20RODRIGUEZ%20AMARO.pdf>
- Rodríguez, M., Latsague, M., Chacón, M., & Astorga, P. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque*, 35(1), 111-118. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Scarpa, G. M., Prota, V., Schianchi, N., & Manunta, F. (2022). *In vitro cultures for the production of secondary metabolites*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101880>
- Schuchovski, C. S., & Biasi, L. A. (2019). In vitro establishment of “delite” rabbiteye blueberry microshoots. *Horticulturae*. <https://doi.org/10.3390/horticulturae5010024>
- Smith, R. H. (2013). *Plant tissue culture: Techniques and experiments*. London: Elsevier. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/book/9780124159204/plant-tissue-culture#book-info>
- Suárez Padrón, I. E. (2020). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad de Córdoba.
- Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K., Komatsu, H., . . . Kunitake, H. (2008). Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae*, 119, 72-74. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.06.028>

- Thuruthikkattil Ram , A., & Jose, L. (2015). *Effect of 6-Benzylaminopurine(BAP) on in vitro shoot multiplication: Of two important medicinal herbs, Centella asiatica (L.) Urb. and Scoparia dulcis L.via leaf segments*. Lambert.
- Toku-E. (2022). *2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid [Imagen]*. Obtenido de Touku-E: <https://tokue.com/2-4-dichlorophenoxyacetic-acid/>
- Torres, M., Trujillo, D., & Arahana, V. (2010). Cultivo in vitro del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Avances en Ciencias e Ingenierías*, 2(2), B9-B15.
<https://doi.org/10.18272/aci.v2i2.27>
- Valverde-Cerdas, L., Rojas-Vargas, A., Hine-Gómez, A., & Azofeifa-Bolaños, J. (2013). Formación de embriones somáticos en *Hieronima alchorneoides* Allemao a partir de embriones cigóticos. *Biotecnología Vegetal*, 13(4). Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/119/894>
- Vargas, K. (2021). *Establecimiento de un protocolo para el aislamiento y purificación de protoplastos de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) a partir de callos provenientes de hojas ex vitro, con base en la recopilación y revisión de material bibliográfico. [Tesis de Pregrado, Universidad de la Fuerzas Armadas]*. Repositorio institucional. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/24836/T-ESPE-044536.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Verde Yañez, L. (2017). *Ensayo de elicitación de suspensiones celulares utilizando como elicitor un extracto de hojas de Moringa oleifera [Tesis de Pregrado, Universidad de Coruña]*. Repositorio Institucional. Obtenido de https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/19620/VerdeYa%c3%b1ez_Lucia_TFG_2017.pdf?sequence=2&isAllowed=y