



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.

Vargas Cedeño, Kathya Denisse

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz Ph.D.

10 de abril del 2021



Document Information

Analyzed document	Documento para urkund_Vargas_Kathya.docx (D97384228)
Submitted	3/5/2021 9:06:00 PM
Submitted by	JADAN GUERRERO MONICA BEATRIZ
Submitter email	mbjadan@espe.edu.ec
Similarity	2%
Analysis address	mbjadan.espe@analysis.orkund.com



Revisado e distribuido por:
MONICA BEATRIZ
JADAN GUERRERO

Mónica Jadán Guerrero, PhD.

C. C: 1802278562



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“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.”**, fue realizado por la señora **Vargas Cedeño Kathya Denisse** 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, 6 de marzo de 2021.



Firmado electrónicamente por:
MONICA BEATRIZ
JADAN GUERRERO

Mónica Beatriz Jadán Guerrero, PhD.

C. C: 1802278562



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Vargas Cedeño Kathy Denisse**, con cédula de ciudadanía n° 1004009419, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“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”** 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 abril de 2021.

Vargas Cedeño Kathy Denisse

C.C.: 1004009419



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Vargas Cedeño Kathya Denisse**, con cédula de ciudadanía n° 1004009419, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“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”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 2 de abril de 2021.

Vargas Cedeño Kathya Denisse

C.C.: 1004009419

Dedicatoria

Con todo el amor:

A mi hijo Víctor Fabián,
mi mejor regalo y mi mayor felicidad.

A mi esposo Víctor Hugo,
compañero ideal y mi gran amor.

A mis padres, Lalo Vargas y Virginia Cedeño,
pilares fundamentales de mi vida.

Kathya Denisse Vargas Cedeño

Agradecimientos

Sobre todo, a Dios por la maravillosa experiencia de pertenecer a la carrera de biotecnología, proteger y guiar el arduo camino hasta llegar a la meta.

A mis padres, Lalo y Virginia por su apoyo total, su lucha incansable por un buen porvenir y su ejemplo de responsabilidad, honestidad y sobretodo humildad.

A mi hijo Víctor Fabián por ser proveedor de cálidas sonrisas, inmensas alegrías y el amor más puro que existe; mi motivación y motor de vida.

A mi amado esposo Víctor Hugo, por tomar de mi mano y sostenerme con fuerza en el camino de ser esposos, padres y profesionales.

A mi guía académica, doctora Mónica Jadán por abrir las puertas hacia la investigación, pero sobre todo las de su corazón y tratarme como a una de sus hijas; exigente, pero con mucho cariño y calidez.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, noble institución que brindó los conocimientos obtenidos, convertida en segundo hogar en la lucha diaria por cumplir con el deber.

A mis amigas Andrea y Belén, por brindarme su amistad incondicional y estar presentes celebrando los buenos momentos y ayudándome a levantar de malos.

Índice

Índice	8
Índice de tablas	13
Resumen	16
Abstract	17
Capítulo 1	18
Introducción	18
Formulación del problema	18
Justificación del problema	20
Objetivos	22
Objetivo General	22
Objetivos específicos	22
Marco Teórico	23
Mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth).....	23
Taxonomía	23
Origen y Distribución	23
Componentes nutricionales	24
Características Morfológicas	25
Usos	26
Enfermedades.....	26
Fitoquímica	27

Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	28
Medios de cultivo	29
Aplicaciones del cultivo de tejidos	30
Protoplastos vegetales	30
Aislamiento de Protoplastos	31
Purificación de Protoplastos	32
Cultivo de Protoplastos	32
Hipótesis	33
Capítulo 2	34
Materiales y métodos	34
Localización del ensayo	34
Procedimientos generales	35
Material vegetal	35
Medios de cultivo y condiciones de esterilización	35
Condiciones generales de cultivo <i>in vitro</i>	36
Desinfección de explantes	36
Inducción y multiplicación de callo	39
Investigación teórica acerca del aislamiento y purificación de protoplastos en especies vegetales cercanas taxonómicamente al mortiño	41
Aislamiento de protoplastos	43
Purificación de protoplastos	48

	10
Cultivo de protoplastos	48
Resultados	51
Desinfección de explantes.....	51
Contaminación	51
Oxidación.....	57
Introducción y multiplicación de callo	59
Crecimiento de callos	60
Investigación teórica acerca del aislamiento y purificación de protoplastos en especies vegetales cercanas taxonómicamente al mortiño.....	62
Aislamiento de protoplastos.....	63
Efecto de la concentración enzimática en la obtención de protoplastos.....	64
Influencia del tiempo de digestión enzimática en el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos.	65
Efecto del pH en el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos.	65
Purificación de protoplastos	68
Efecto de la concentración del estabilizador de estrés osmótico en el rendimiento de los protoplastos.	68
Efectos de la velocidad y el tiempo de centrifugación en la purificación de los protoplastos.	69
Cultivo de protoplastos.....	70
Capítulo 4	72

	11
Discusión	72
Desinfección de explantes.....	72
Contaminación	73
Oxidación.....	75
Introducción y multiplicación de callos.....	77
Investigación teórica acerca del aislamiento y purificación de protoplastos en especies vegetales cercanas taxonómicamente al mortiño.	79
Aislamiento de protoplastos	79
Efecto de la concentración enzimática en la obtención de protoplastos.....	81
Influencia del tiempo de digestión enzimática en el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos.	83
Efecto del pH en el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos.	83
Purificación de protoplastos	84
Efecto de la concentración del estabilizador de estrés osmótico en el rendimiento de los protoplastos.	85
Efectos de la velocidad y el tiempo de centrifugación en la purificación de los protoplastos.	86
Cultivo de protoplastos.....	86
Capítulo 5	89
Conclusiones.....	89
Capítulo 6	91

Recomendaciones	91
Bibliografía	92
Anexos	98

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Contenido nutricional en 100 g de fruto de mortiño.</i>	24
Tabla 2. <i>Tratamiento general de desinfección de hojas de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth).</i>	38
Tabla 3. <i>Tratamientos de desinfección empleados con base en la concentración y tiempo de exposición del fungicida Skul-27 en explantes de hoja de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth).</i>	38
Tabla 4. <i>Tratamientos para la inducción de callos a partir de explantes de hoja de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth).</i>	40
Tabla 5. <i>Medios de cultivo probados para la regeneración de plantas de Arabidopsis thaliana a través de protoplastos.</i>	50
Tabla 6. <i>Número de explantes contaminados por hongo o bacteria y explantes sin contaminación.</i>	53
Tabla 7. <i>Resumen de la prueba ANOVA para determinar diferencias significativas entre los tratamientos de desinfección para la contaminación con hongo.</i>	53
Tabla 8. <i>Resumen del Test de Tukey a fin de determinar el tratamiento de desinfección con mayor diferencia para contaminación con hongo.</i>	54
Tabla 9. <i>Resumen de la prueba ANOVA para determinar diferencias significativas entre los tratamientos de desinfección para la contaminación con bacteria.</i>	55
Tabla 10. <i>Resumen del Test de Tukey a fin de determinar el tratamiento de desinfección con mayor diferencia para contaminación con bacteria.</i>	56
Tabla 11. <i>Resumen de la prueba ANOVA para determinar diferencias significativas entre los tratamientos contra la oxidación de los explantes.</i>	57

Tabla 12. <i>Resumen del Test de Tukey a fin de determinar el tratamiento de desinfección con mayor diferencia en el promedio de explantes vivos.</i>	58
Tabla 13. <i>Resumen de la prueba ANOVA para determinar diferencias significativas entre los tratamientos para el crecimiento de callo en los explantes.</i>	60
Tabla 14. <i>Resumen del Test de Tukey a fin de determinar el tratamiento de inducción a callo con mayor diferencia en el promedio de explantes que presentan crecimiento de callo.</i>	61
Tabla 15. <i>Tipo y origen del explante utilizado en la obtención de protoplastos de cada especie vegetal analizada.</i>	64
Tabla 16. <i>Cóctel enzimático, tiempo de digestión enzimática y pH utilizado en la obtención de protoplastos de cada especie vegetal.</i>	66
Tabla 17. <i>Valores de rendimiento y viabilidad calculados en cada especie vegetal analizada.</i>	67
Tabla 18. <i>Regulador osmótico utilizado en el proceso de purificación de protoplastos de cada especie vegetal analizada.</i>	68
Tabla 19. <i>Velocidad y tiempo de centrifugación aplicada para la purificación de protoplastos en cada especie vegetal analizada.</i>	70

Índice de figuras

Figura 1. <i>Planta (A) y fruto (B) de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)</i>	25
Figura 2. <i>Flujo de trabajo del aislamiento de protoplastos por el método enzimático</i>	44
Figura 3. <i>Contaminación observada a los 21 días de siembra en explantes de hoja de mortiño..</i>	52
Figura 4. <i>Número de explantes contaminados por hongo</i>	55
Figura 5. <i>Número de explantes contaminados por bacteria</i>	57
Figura 6. <i>Número de explantes vivos.</i>	59
Figura 7. <i>Crecimiento de callos</i>	60
Figura 8. <i>Número de explantes con crecimiento de callo.</i>	62

Resumen

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) es una planta arbustiva de crecimiento natural en los páramos del Ecuador, su fruto contiene altos niveles de compuestos fenólicos antioxidantes y antiinflamatorios, razón por la cual su demanda ha incrementado en los últimos años. El mejoramiento genético mediante técnicas de cultivo *in vitro* de esta especie, es una alternativa para mejorar su calidad y cubrir la demanda del mercado. En el presente trabajo de investigación se logró establecer callos a partir de explantes de hojas *ex vitro* de mortiño. En la primera etapa experimental, se realizó la desinfección de los explantes resultando como mejor tratamiento aquel con una concentración de 4 ml/L de fungicida Skul – 27 durante 5 minutos de exposición, al igual que para mantener los explantes viables. La inducción a callo tuvo la mayor tasa de crecimiento en medio WPM (Woody Plant Medium) suplementado con 2.5 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). El análisis bibliográfico del aislamiento y purificación de protoplastos de plantas de la misma familia del mortiño, se basó en documentos científicos. Así pues, en dicho análisis se demuestra que el mayor porcentaje de protoplastos aislados, del mesófilo de las hojas o de callos, se logró con una solución enzimática de celulasa 2%, más macerozima 1%, o pectinasa en combinación con manitol de 0.25 a 1M como regulador osmótico. A su vez, una purificación de alta calidad se consigue con ciclos de centrifugación a una velocidad de 1000 rpm hasta 5 minutos, con una solución de lavado CPW (Cell and Protoplast Washing) y manitol.

Palabras clave:

- MORTIÑO
- PROTOPLASTO
- AISLAMIENTO
- PURIFICACIÓN

Abstract

The mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) is a shrubby plant that grows naturally in the highlands of Ecuador. Its fruit contains high levels of antioxidant and anti-inflammatory phenolic compounds, which is why its demand has increased in recent years. Genetic improvement through in vitro cultivation techniques of this species is an alternative to improve its quality and meet market demand. In the present study, we were able to establish corns from ex vitro explants of mortiño leaves. In the first experimental stage, the explants were disinfected and the best treatment was that with a concentration of 4 ml/L of Skul-27 fungicide during 5 minutes of exposure, as well as to maintain the explants viable. Callus induction had the highest growth rate in WPM medium (Woody Plant Medium) supplemented with 2.5 mg/L of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). The bibliographic analysis of the isolation and purification of protoplasts from plants of the same family as the mortiño was based on scientific papers. Thus, this analysis shows that the highest percentage of isolated protoplasts, from leaf mesophyll or callus, was achieved with an enzymatic solution of cellulase 2%, plus macerozyme 1%, or pectinase in combination with 0.25 to 1M mannitol as osmotic regulator. In turn, high quality purification is achieved with centrifugation cycles at a speed of 1000 rpm for up to 5 minutes, with a CPW (Cell and Protoplast Washing) washing solution and mannitol.

Keywords:

- **MORTIÑO**
- **PROTOPLAST**
- **ISOLATION**
- **PURIFICATION**

Capítulo 1

Introducción

Formulación del problema

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) pertenece a la familia Ericaceae, la más diversa en América Tropical donde cuenta con cerca de 900 especies de las cuales aproximadamente el 94% son endémicas y se encuentran concentradas en Ecuador y Colombia, en los bosques nublados desde los 1000 a 3000 metros de altura (Pedraza, Valencia, Rommel, & Santiana, 2019). Es un arbusto silvestre que se encuentra dentro de las casi 500 especies del género *Vaccinium*, cuyo nombre fue asignado por Linneo en 1737 (Medina, Loba, Castaño, & Cardona, 2015). Esta planta crece naturalmente en los páramos de nuestro país, así como también en Colombia, Bolivia, Perú y Venezuela, a una temperatura alrededor de los 8°C (Coba, et al., 2012).

A pesar de que algunos estudios demuestran que el mortiño contiene altos porcentajes de vitamina B, C, antocianinas y flavonoides, brindando beneficios antioxidantes, no existe un cultivo tecnificado del mismo debido a la falta de un método eficiente para la propagación masiva de plantas madre, libres de enfermedades y de rápido crecimiento (Gallardo de la Puente, 2015).

Además, en el Ecuador la investigación científica de esta planta se ha limitado a estudios de caracterización botánica (Coba, et al., 2012), y aplicaciones gastronómicas (Loor & Zambrano, 2016), habiendo apenas dos trabajos de su cultivo *in vitro* realizados por Trujillo (2009) y Cobo, Gutiérrez, & Torres (2018), ambos en la Universidad San Francisco de Quito, titulados: “Cultivo *in vitro* del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)” y “Regeneration of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) plants through axillary bud culture” respectivamente. A pesar de la escasa

información científica acerca del mortiño, existen numerosos estudios del arándano, el cual pertenece al mismo género del mortiño, aportando de manera significativa a las técnicas de cultivo *in vitro* para el mismo (Trujillo, 2009). Dichos estudios se deben al alto interés económico que tiene el arándano, al ser un producto de gran beneficio medicinal y nutricional como lo son las especies: *V. myrtillus* L., *V. meridionale* Swartz y *V. corymbosum* L.

Las plantas de la familia Ericaceae poseen propiedades medicinales importantes debido a la alta cantidad de polifenoles, antocianidinas, proantocianidinas, y flavonoides que tienen actividad antioxidante (Coba, et al., 2012). Dentro de la cultura ecuatoriana, el fruto del mortiño es aprovechado para la elaboración de mermeladas, jugos, vinos y la colada morada en la celebración del día de los difuntos, como parte de nuestra tradición en el mes de noviembre (Ecuador Travel, 2019).

Hoy en día, muchas actividades relacionadas a la productividad agrícola como: la expansión de terreno para la agricultura, la quema de pajonal, la apertura de carreteras para ingreso y la minería amenazan al ecosistema de los páramos, a esto se suman muchos emprendimientos dentro de nuestro país, que utilizan el mortiño tanto en la parte gastronómica, así como también en la elaboración de variados productos como jabones, fragancias y cremas corporales, lo cual ha provocado que exista una mayor demanda y por ende prácticas inapropiadas de recolección del fruto y sobrecosecha en los páramos (Cuesta, Sevink, Llambí, De Bièvre, & Posner, 2014). Razón por la cual, el consumo del mortiño, como el de otros recursos naturales de relevancia agrícola, debe llevarse a cabo de forma consciente y responsable, pues al no ser de esta manera, las malas prácticas agrícolas pueden afectar aún más los páramos andinos catalogados como uno de los más importantes centros de biodiversidad (Loor & Zambrano, 2016).

Hasta el momento en el Ecuador, no se conoce la implementación de prácticas sustentables con recomendaciones técnicas para la siembra del mortiño, de hacerlo se conseguiría cultivar mortiño de mayor calidad, siendo ésta una especie fundamental en procesos de restauración y recuperación de suelos, y cuyo crecimiento es espontáneo en los páramos (Rache & Pacheco, 2010). En el caso de desarrollarse alguna técnica de siembra representaría un medio de mejora económica para los pequeños productores de zonas altas, así como para el país en general que cuenta con el clima y los suelos adecuados para este cultivo (Hine & Abdelnour, 2013).

Al ser notoria la gran demanda del fruto de mortiño y su baja oferta de producción y mejoramiento de la calidad, se evidencia la necesidad de realizar investigaciones relacionados al cultivo y propagación de esta planta, pudiéndose utilizar las herramientas biotecnológicas que han aportado con buenos resultados en el área vegetal, como lo son las técnicas de cultivo *in vitro*, las cuales agrupan un conjunto de herramientas que, bajo condiciones controladas óptimas, han permitido la obtención de diverso material vegetal, como protoplastos, células, tejidos, órganos hasta plantas completas en un medio de cultivo artificial compuesto por factores de crecimiento (Segretín, 2019).

Justificación del problema

En el campo de la medicina, se ha descubierto que los berries o frutos del bosque tienen muchos beneficios en la salud humana, principalmente por su contenido vitamínico y antioxidante. El arándano, por ejemplo, contiene niveles elevados de fósforo y calcio que favorecen a la memoria y formación de los huesos; vitamina C y B₁ que previenen enfermedades

del sistema nervioso; además flavonoides y antioxidantes que evitan infecciones y envejecimiento celular (Coba, et al., 2012).

Debido a su alto valor nutricional y su poder antioxidante el consumo del mortiño, y de otras especies de la misma familia, como el arándano, ha ido incrementando. Dado este incremento, una estrategia de cultivo y mejora del mortiño es indispensable para aumentar su producción y tener disponibilidad de material para cubrir la demanda del mercado nacional e internacional (Hine & Abdelnour, 2013).

Dentro de los estudios realizados a las plantas con tal importancia, la vía del mejoramiento genético ha sido la más utilizada en beneficio de la humanidad para la obtención de variedades resistentes a patógenos o a cualquier ambiente adverso, de modo que la producción agrícola tenga una mayor eficacia y rendimiento. Una de las técnicas biotecnológicas que ha conseguido resultados importantes para mejorar la calidad de los frutos de diferentes plantas de importancia económica a nivel mundial, otorgando resistencia o tolerancia contra plagas, enfermedades y condiciones desfavorables es la formación de híbridos por medio del aislamiento, cultivo, regeneración, fusión y transformación de protoplastos, incluso entre los genotipos que no han podido ser hibridados de manera tradicional (Kumari, 2019).

Dados los beneficios para la salud encontrados en el mortiño por su capacidad antioxidante, se ha considerado a su fruto como un potencial alimento, al cual aplicando las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se puede conseguir una producción óptima y un mejoramiento de su calidad. Existe la posibilidad de inducir variabilidad somaclonal en el mortiño a través de la fusión de sus protoplastos con los de arándano, ya que usando técnicas tradicionales como la propagación sexual se ha visto que su desarrollo es lento y la mayoría de plántulas no son viables; y con propagación asexual los porcentajes de enraizamiento son muy bajos (Rache & Pacheco, 2010).

Esta técnica de mejoramiento, que consiste en el rompimiento de la pared celular para producir la fusión de las membranas de dos o más células, dará lugar a un híbrido somático lo cual, en este caso, permitiría combinar los genes parentales en plantas superiores con características del mortiño potenciadas de forma que se amplíe su demanda y fomente su producción agroindustrial (Castro, 2017).

Objetivos

Objetivo General

- Establecer 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.

Objetivos específicos

- Inducir a la formación de callos *in vitro* de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) a partir de segmentos de hoja *ex vitro*.
- Estandarizar un protocolo para el aislamiento de protoplastos a partir de callos *in vitro* de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), con base en la revisión de material bibliográfico.
- Estandarizar un protocolo para la purificación de protoplastos obtenidos a partir de callos *in vitro* de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), con base en la revisión de material bibliográfico.

Marco Teórico

Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

Taxonomía

La clasificación Taxonómica del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) según (Pérez & Valdivieso, 2007):

- Reino: *Plantae*
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Ericales
- Familia: Ericaceae
- Género: *Vaccinium*
- Especie: *floribundum*

Nombre común: mortiño, agraz, uva de monte, camueza, vichacha.

Origen y Distribución

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) es originario de la zona norte de la Cordillera de los Andes, la familia Ericaceae a la que pertenece, se encuentra catalogada dentro del país con el mayor endemismo. Es una familia diversa que cuenta con 22 géneros y 221 especies en zonas montañosas y bosques nublados del Neotrópico, las cuales están distribuidas en los Andes de

varios países como: Ecuador, Colombia, Bolivia y Perú (Pedraza, Valencia, Rommel, & Santiana, 2019). Las especies que se han reconocido dentro del país son: *Vaccinium floribundum* Kunth, *Vaccinium distichum* Luteyn y *Vaccinium crenatum* Sleumer, siendo la primera la que se presenta con mayor frecuencia en toda la Sierra; mientras que las dos últimas están localizadas en las provincias de Azuay y Loja (Coba, et al., 2012)

Esta planta nativa ha permanecido sin domesticación en los páramos ecuatorianos, crece de manera silvestre en partes altas de entre 3400 hasta 4500 m.s.n.m., siendo parte de la alimentación autóctona de las poblaciones andinas y a pesar de que no existe un cultivo tecnificado del mortiño, su fruto es comercializado para su empleo en la elaboración de mermeladas, jugos, vinos y la colada morada en la celebración del día de los difuntos, como parte de la tradición y cultura ecuatoriana (Coba, et al., 2012).

Componentes nutricionales

Se conoce que los frutos de mortiño contienen cantidades importantes de antioxidantes, así como azúcares, minerales como potasio y calcio además de vitaminas del complejo B, y C (Pérez & Valdivieso, 2007). Además, se encuentran libres de grasas, colesterol y sodio; son ricos en fibra y se considera un fruto astringente tónico y refrescante (Mayorga, 2012).

Tabla 1.

Contenido nutricional en 100 g de fruto de mortiño.

Componente		Cantidad
Proteína	g	0.7
Grasa	%	0.7

Carbohidratos	%	6.34
Fibra	%	9.86
Vitamina C	%	10.56

Nota. Tomado de Muñoz, 2004

Características Morfológicas

Es un arbusto que presenta un crecimiento vertical con muchas ramas, puede medir entre 0,2 a 2.5 metros de altura, sus hojas delgadas, son coriáceas, elípticas, ovaladas u ovaladas-lanceoladas, su base es cuneada a redonda, su ápice es acuminado, y su margen es crenado-aserrado, presenta inflorescencias axilares con racimos de 6 a 10 flores rosadas, su fruto es redondo, de un color azulado a casi negro cubierto de un polvo blanquecino, algunas veces dulce, cuyo diámetro está entre los 5 a 8 mm y contiene numerosas pero difícilmente detectables pequeñas semillas (Pérez & Valdivieso, 2007).

Figura 1.

Planta (A) y fruto (B) de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)



Nota. Tomado de Gallardo de la Puente, 2015.

Usos

La popularidad del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt) ha ido incrementando conforme avanzan los estudios en relación al mismo, y de especies del mismo género no solo por sus compuestos antioxidantes naturales, sino en combinación con sus propiedades antiinflamatorias (Muñoz, 2004).

Los cultivos de esta planta se producen de forma espontánea mediante la propagación de semillas, en parcelas del páramo, cuyo suelo es arenoso y rico en materia orgánica. Para la comercialización dentro del país, los frutos del mortiño que crecen en las plantas silvestres del páramo son cosechados de esta única fuente en dos periodos; la primera cosecha, en los meses de septiembre hasta diciembre; y la segunda con menor producción, se realiza entre abril y mayo (Mayorga, 2012). Se consume esta fruta a nivel nacional principalmente para elaborar la tradicional colada morada, un plato típico ecuatoriano del día de los difuntos, también se producen mermeladas, helados, pasteles, jugos, vinos y productos de belleza y cuidado personal como jabones, fragancias y cremas corporales (Guerrero, 2019).

El arbusto del mortiño también es utilizado por campesinos para aliviar dolores causados por el reumatismo, cólicos abdominales y fiebre; también lo usan para calmar problemas del hígado y los riñones (Coba, et al., 2012). También se menciona que esta planta se utiliza para regenerar zonas quemadas del páramo lo cual ayuda en la restauración de los mismos.

Enfermedades

De la observación en campo, al ser una planta silvestre y poco estudiada, se puede notar a simple vista la resistencia que presenta a ciertas plagas, especialmente a hongos que crecen en

el mismo territorio, sobre todo cuando la humedad del sitio aumenta por la lluvia. Esta evaluación concuerda con Muñoz, 2004 que menciona la inexistencia de problemas fitosanitarios graves en el mortiño, y tampoco presenta enfermedades que le afecten en su estado silvestre. Además, su crecimiento en páramos le permite adaptarse a condiciones ambientales adversas como las bajas temperaturas que oscilan entre 8 y 15°C (Coba, et al., 2012).

Fitoquímica

Dentro de los compuestos bioactivos que tiene el mortiño se encuentran el ácido hidroxicinámico, ácido ceféico, ácido clorogénico y antocianinas presentes en un 67 % del total fenólico. En estado fresco, se puede medir la acidez titulable del fruto de mortiño con relación a la cantidad de ácido cítrico. Una temperatura baja disminuye el desdoblamiento de ácidos presentes en mortiño, por lo que el tipo de almacenamiento del fruto está directamente relacionado con su acidez (Mayorga, 2012).

Guerrero, 2019 indica que la capacidad antioxidante del mortiño se debe a los fenoles totales presentes en el fruto y se mide por la capacidad de absorber los radicales presentes en el oxígeno, y está comprobado que el consumo de frutas y hortalizas que poseen un alto contenido de fenoles, se relaciona con una baja incidencia de distintos tipos de cáncer. Por otro lado, las antocianinas que son el pigmento de color morado casi negro característico del mortiño, comparten la responsabilidad de la capacidad antioxidante de los frutos, ayudando a la prevención de la oxidación y protegiendo contra los radicales libres. Además, el mortiño contiene vitamina C y E, compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante similar o mayor que otros frutos de la familia *Vaccinium* (Guerrero, 2019).

Cultivo de tejidos *in vitro*

Espinosa, Puente y García, 2018 se refieren al cultivo de células y tejidos vegetales como el conjunto de técnicas que se usan para el crecimiento de células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones controladas asépticas, libres de microorganismos. Esta técnica se apoya en el principio de totipotencia, que demuestra que cualquier célula vegetal contiene como material genético una copia del de la planta madre sin tener en cuenta su función o posición dentro de ella, y por lo tanto tiene la capacidad de regenerar una planta completamente nueva (Calva & Pérez, 2005). Dicho proceso incluye la transformación de una célula en un órgano o una planta se conoce con el nombre de organogénesis.

En general, el procedimiento consiste en inocular un medio de cultivo gelificado, suplementado con los reguladores de crecimiento auxinas o citoquinas y vitaminas, con un fragmento de tejido u órgano vegetal, llamado explante, previamente desinfectado para eliminar todo organismo presente en su superficie. La incubación del cultivo se realiza bajo condiciones ambientales controladas de luz, temperatura y humedad, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales llevan al explante hacia la formación de una masa de células amorfa que se denomina callo, o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos o embriones (Espinosa, Puente, & García, 2018). Los callos que se logren obtener pueden subcultivarse para su mantenimiento y propagación, para inducir su diferenciación en la formación de órganos (organogénesis), embriones (embriogénesis) o pasarse a un medio de cultivo líquido para conseguir células y pequeños agregados en suspensión (Espinosa, Puente, & García, 2018).

Medios de cultivo

Se encuentran definidos como aquellas formulaciones de sales inorgánicas y compuestos orgánicos que se requieren para nutrir y manipular los cultivos *in vitro*. Dichos medios de cultivo, pueden prepararse con base a las soluciones de macro y microelementos o también se encuentran disponibles y a la venta listos para ser utilizados en la micropropagación de plantas. Dentro de la composición básica de un medio de cultivo se encuentran: una fuente de carbono como la sacarosa que se usa mayormente, nutrientes minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento o fitorreguladores y un agente gelificante, en el caso de los medios semisólidos donde se utiliza más el agar (0,6 a 1%) (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010).

En los primeros cultivos de células y tejidos vegetales se utilizaron medios semisintéticos. Los cuales contenían extractos o complejos orgánicos tales como el agua de coco, hidrolizado de caseína y extractos de levadura. Hoy en día, la mayoría de los medios son de composición conocida. El medio de cultivo MS, formulado por Murashige & Skoog (1962), o el WPM (Woody Plant Medium), formulado por Lloyd & McCown (1981) son los medios basales más empleados en la actualidad, a su vez existen otros de acuerdo a las necesidades nutricionales de cada especie vegetal. Los reguladores de crecimiento más utilizados son ANA (ácido naftalenacético) y BA (bencil adenina). Siendo también efectivas las auxinas como IBA (ácido indolbutírico) y 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), y citocininas como 2iP (2-indolaminopurina), CIN (cinetina), ZEA (zeatina) y TDZ (thidiazuron) (Calva & Pérez, 2005).

Aplicaciones del cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos vegetales aprovecha la capacidad de totipotencia que tiene cada célula, esto quiere decir que a partir de ella se puede regenerar una planta completa debido a que, dentro de las células, independientemente de su función y posición en la planta, hay una copia exacta de su material genético (Calva & Pérez, 2005). Esto permite la micropropagación de especies que no han tenido éxito mediante un cultivo tradicional, que tienen fines agrícolas por su interés económico o que se encuentran con amenaza de extinción. Además, el cultivo *in vitro* permite acelerar procesos de selección cuando se realizan ensayos de mejoramiento genético (Castañeda, Gómez, Trejo, & González, 2014).

De acuerdo a Segretín, 2019 se puede enlistar algunas de las aplicaciones específicas que tiene el cultivo de tejidos vegetales hoy en día:

- Clonación de plantas cuyas características son requeridas para una mejor producción agrícola y a bajo costo.
- Obtención de plantas con alta calidad fitosanitaria.
- Formación y desarrollo de semillas sintéticas.
- Obtención y análisis de metabolitos secundarios.
- Impulso de nuevas perspectivas para la conservación de germoplasma.

Protoplastos vegetales

Protoplasto es un término que fue utilizado por el microbiólogo botánico alemán Johannes Hanstein en 1880, para describir un componente vivo encerrado por la membrana

celular. Por tanto, se trata de una célula desnuda cuya pared celular ha sido destruida por medio de procesos mecánicos o enzimáticos. Al contener los organelos celulares y el núcleo, tiene la capacidad de regenerar su pared celular, crecer y después dividirse para así formar una nueva planta aplicando las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Torres, 2019).

Hoy en día los protoplastos son herramientas claves en los estudios de localización de proteínas y canales iónicos, así como también en evaluaciones de función de genes por medio de ARN de interferencia. Son aplicados en hibridación somática para lograr el cruce de diferentes especies de una misma familia, lo cual no es posible mediante técnicas convencionales de cultivo (Poot & Hernández, 2013).

Aislamiento de Protoplastos

Los protoplastos pueden aislarse a partir de células o tejidos vegetales mediante la utilización de enzimas degradadoras de la pared celular como celulasas, hemicelulasas y pectinasas aisladas de hongos (*Trichoderma viride*, *Rhizopus sp.*), esta opción permite transferir características idénticas a las de las plantas madres (Escalante, 2014). El empleo de enzimas es el método más utilizado, debido a que permiten que los protoplastos se liberen exitosamente de casi todos los tejidos, sin embargo, se puede incurrir en contaminación si se incluyen demasiados pasos (Guerra, 2018). Un segundo método permite aislar protoplastos de forma mecánica, aplicando choques osmóticos capaces de producir plasmólisis celular, se logra romper la pared por medio de pequeños cortes, así los protoplastos se liberan al darse el restablecimiento osmótico (Arcos, 2010).

El rendimiento tanto del aislamiento como de la purificación de los protoplastos va a depender del estado fisiológico del tejido vegetal a utilizarse, en plantas leñosas como es el caso del mortiño, es recomendable que se empleen explantes jóvenes puesto que tienen menor probabilidad de poseer microorganismos endógenos, por ende, menor riesgo de causar contaminación *in vitro*, además de presentar una rápida respuesta al tratamiento de introducción (Alburqueque & Gusqui, 2018).

Purificación de Protoplastos

Cuando el proceso de aislamiento ha culminado, se debe eliminar los restos celulares, enzimas y fracciones de tejido que quedan en el medio dado que éstos pueden intervenir. Para separar dichos restos, se puede utilizar un filtro de nylon, con un diámetro de poro entre 30 y 100 μm , por el cual pase la suspensión quedando retenidos todos los residuos. Seguido, se centrifuga la suspensión, a una velocidad de 50 hasta 100g, 3 o más veces para que los protoplastos se sedimenten y luego puedan ser resuspendidos en una solución salina donde se encuentre el regulador osmótico (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010). Por medio de un conteo celular de los protoplastos aislados, puede lograrse el control de su viabilidad promedio, este procedimiento se puede realizar empleando un hemocitómetro o realizando una tinción que puede ser fluorescente o no fluorescente (Castro, 2017).

Cultivo de Protoplastos

Normalmente, el cultivo de protoplastos se realiza en cajas de Petri en un medio de cultivo líquido o semisólido, el cual contiene los compuestos orgánicos e inorgánicos requeridos, así

como también reguladores de crecimiento y un estabilizador osmótico. Al sembrar, se mezcla la solución de protoplastos con el medio de cultivo líquido que contiene un porcentaje de agar, de esta forma los protoplastos quedan atrapados en el medio semisólido y, al pasar algunos días, se pueden observar las colonias formadas. Por lo general, de uno a cuatro días, los protoplastos ya serán capaces de regenerar su pared celular. Con la pared podrán lograr que su división sea regular. Al cabo de dos o tres semanas, se forman microcolonias producto de repetidas mitosis, derivadas cada una de una célula, que luego de dos semanas se podrán ver a simple vista. Los callos formados podrán ser transferidos a un medio de cultivo y con las condiciones apropiadas se regenerarán plantas (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010).

Hipótesis

El aislamiento de protoplastos a partir de callos de explantes de hoja *in vitro* de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt), se logra empleando adecuadamente procedimientos similares realizados en plantas de la familia Ericaceae u otra del tipo arbustiva.

Capítulo 2

Materiales y métodos

Localización del ensayo

La realización del proyecto se llevó a cabo en dos fases. La primera fase corresponde a la recolección de muestras de las plantas de mortiño, este trabajo de campo se realizó en el Cerro Pasochoa, ubicado en el cantón Mejía de la provincia de Pichincha, Ecuador, a una altitud de 4200 msnm (Latitud -0.433333° , Longitud -78.483333°). Previo a un reconocimiento, se identificó la existencia de plantas de mortiño en el lugar. Se seleccionó esta área, ya que en el medio no hay presencia de animales como ganado vacuno o caballos que contaminen las plantas con sus excrementos.

Al momento de recolectar las muestras, se escogieron plantas jóvenes, visualmente sanas y sin mayores alteraciones, de estas se tomaron las ramas de la cima que contenía el tejido más joven. Cada muestra fue colocada en un cooler que contenía papel periódico y hielo en su interior, para preservar el estado fresco del material vegetal hasta su llegada al laboratorio, donde continuó la fase experimental.

La fase de laboratorio de esta investigación se realizó en los laboratorios de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, localizada en Sangolquí, Cantón Rumiñahui, Av. El Progreso s/n, provincia de Pichincha, $0^{\circ} 18,81$ S; $78^{\circ} 26,64$ O; a una altitud de 2516 m.s.n.m.

Procedimientos generales

Material vegetal

Las hojas de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) que se recolectaron para este proyecto de investigación provenientes del cerro Pasochoa, se tomaron durante las primeras horas del día con una temperatura alrededor de 8°C. El suelo del lugar presentaba un color oscuro y era de tipo limoso con arena fina (González, 2012).

Los arbustos que se eligieron para tomar las muestras, tenían un aspecto semi leñoso de aproximadamente 2 metros de altura en un estado vegetativo adulto. Se tomaron los segmentos de tallo de la parte superior de la planta que contenían las hojas más jóvenes y sanas visiblemente. El procedimiento de muestreo se realizó empleando tijeras de podar, previamente desinfectadas con alcohol al 70%, con las cuales se cortaron las ramas de aproximadamente 15 cm de longitud. Posteriormente, se transportaron envueltas en papel periódico mojado con agua estéril, en el interior de un cooler con hielo en gel, para preservar el estado fresco del material vegetal hasta su llegada al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

Medios de cultivo y condiciones de esterilización

En matraces de 250 ml de capacidad se preparó el medio de cultivo semisólido Woody Plant Medium (WPM, Lloyd McCown 1981), compuesto por sales minerales usadas para la propagación de muchas especies de plantas leñosas. Posteriormente, en frascos de vidrio de 100 ml se dosificaron 30 ml de este medio de cultivo, previamente se ajustó el pH a 6.0 con NaOH 1 N y HCl 1 N. Para finalizar se esterilizó el medio de cultivo dispensado, en una autoclave horizontal

(Marca: Tuttnauer, Procedencia: Estados Unidos) a 121°C y 1.2 kg /cm² de presión durante 20 minutos.

La esterilización de todos los instrumentos utilizados, se realizó dentro de la cámara de flujo laminar horizontal (Marca: Streamline, Procedencia: Estados Unidos) mediante flameo con mecheros de alcohol, de esta forma el manejo del material vegetal se llevó a cabo bajo condiciones estériles.

Condiciones generales de cultivo *in vitro*

La introducción de los explantes en los frascos de vidrio con medio de cultivo semisólido WPM, se efectuó en un cuarto de siembra, mismo que contó con condiciones controladas tales como: temperatura de 20±2°C y humedad relativa del 70%. Una vez sembrados los explantes se incubaron en total oscuridad por un tiempo de 21 días.

Desinfección de explantes

El objetivo de este experimento fue establecer un protocolo de desinfección adecuado para la introducción de explantes de hoja de mortiño libres de contaminación, variando las concentraciones de fungicida. Para ello se acepta como válido solamente aquel protocolo que dé como resultado una contaminación menor al 20% (Malajovich, 2008).

Para la elección de las hojas con mejores características para el ensayo, se debe considerar a aquellas hojas más jóvenes; puesto que ellas tienen menor probabilidad de poseer

microorganismos endógenos, consecuentemente, menor riesgo de causar contaminación *in vitro*, además de presentar una rápida respuesta al tratamiento de introducción (Alburqueque & Gusqui, 2018).

Con el fin de establecer un protocolo que permita eliminar microorganismos causantes de contaminación en los explantes, previo al cultivo *in vitro*, se utilizó el fungicida sistémico de amplio espectro formulado en base de sulfato de cobre pentahidratado, (Skul-27). Este procedimiento se consideró como parte del protocolo, debido a que en ensayos anteriores de introducción de explantes de hoja de mortiño se observó la presencia de contaminación por hongos que provenía del mismo explante, es decir, una contaminación endógena. Este fungicida posee una acción preventiva y curativa contra bacterias y hongos que afectan raíces, tallos, follaje y frutos (Alburqueque & Gusqui, 2018).

Para la continuación del protocolo de desinfección, se utilizó un método químico en el cual se utiliza como agente desinfectante hipoclorito de sodio (NaClO). Además de someter a los explantes a las etapas de lavado en agua corriente, exposición a detergente y desinfección con etanol, siguiendo los protocolos presentados por Trujillo, 2009 en sus investigaciones de cultivo *in vitro* de mortiño y a partir de los cuales se diseñó el tratamiento presentado en la tabla 2.

Los tiempos elegidos para la aplicación del protocolo de desinfección durante el ensayo fueron de 5, y 10 minutos en soluciones de 2 ml/L y 4 ml/L de fungicida Skul-27, lo que resultó en la combinación de 6 tratamientos con 3 repeticiones por cada uno, tal como se presenta en la tabla 3.

Tabla 2.

Tratamiento general de desinfección de hojas de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth).

Fase	Lavado	Detergente	Etanol	Hipoclorito de sodio
Tiempo	20 minutos	10 minutos	3 minutos	5 minutos
Concentración	---	2%	70%	2,5%

Tabla 3.

Tratamientos de desinfección empleados con base en la concentración y tiempo de exposición del fungicida Skul-27 en explantes de hoja de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth).

Tratamiento	Concentración Skul-27 (ml/L)	Tiempo inmersión (min)
Control	0	0
1	0.5	
2	2	5
3	4	
4	0.5	
5	2	10
6	4	

El cultivo de los explantes fue llevado a cabo en condiciones de asepsia dentro de una cámara de flujo laminar, insertándose en medio de cultivo semisólido Woody Plant Medium (WPM, Lloyd and McCown 1981) suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a una concentración de 2 mg/L, con 30 gL⁻¹ de azúcar y 7,5 gL⁻¹ de agar como agente gelificante. Se dispuso de 15 frascos de vidrio de 150 ml de capacidad para cada tratamiento, dosificados con 30 ml de medio de cultivo semisólido.

Como parte del procedimiento, a cada hoja se le cortaron los bordes para formar un cuadrado de aproximadamente 1 centímetro por lado, a fin de eliminar el necrosamiento que pudo haberse dado por la exposición a los agentes químicos. A continuación, se colocaron tres explantes en cada frasco de medio semisólido como parte del ensayo previsto.

Finalmente, para identificar parámetros de calidad en el experimento, se evaluó la presencia (1) o ausencia (0) de contaminación, tanto por bacterias como por hongos, al cabo de 15 y 21 días posteriores a la siembra. Como otro punto, se evaluó la viabilidad de los explantes en el medio de cultivo semisólido, tomando como explantes viables (1) a aquellos que no presentaron necrosamiento.

Para relacionar la información obtenida, se tomó como unidad experimental cada explante sembrado en un frasco de vidrio y se realizaron 15 repeticiones en los frascos para cada tratamiento. Es importante mencionar que, para el análisis estadístico se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) y pruebas de significancia de Tukey, las mismas que se emplearon para determinar el número de subgrupos formados según las diferencias y las similitudes de las medias en los diferentes tratamientos de desinfección de explantes de hoja *in vitro* de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).

Inducción y multiplicación de callo

Este ensayo tuvo como objetivo inducir a la formación de callos a partir de un explante de hoja de mortiño y mantener su crecimiento para su posterior multiplicación. El cultivo de callos se utiliza comúnmente para diferentes propósitos, tales como el estudio de procesos fisiológicos, bioquímicos y el mejoramiento vegetal cuando es posible regenerar plantas completas. Cabe mencionar que el proceso de inducción a callo conduce a variabilidad somaclonal y algunos de los

cambios en las plantas regeneradas pueden resultar en atractivas variantes con potencial utilidad dentro del mejoramiento de especies vegetales. (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010).

Para la producción de callo se requiere de un explante inicial, de preferencia en estado juvenil que tenga una alta diferenciación de sus tejidos, como un segmento de raíz, tallo u hoja, o tejidos menos diferenciados como hipocótilos y cotiledones de plántulas (Rodríguez, Latsague, Chacón, & Astorga, 2014).

Además, los múltiples mecanismos de acción de los reguladores de crecimiento son los responsables de la inducción a calogénesis, así como también los cortes realizados en el tejido. Las auxinas especialmente, provocan la dilatación de la célula haciendo que esta se agrande y por ende se divida con mayor frecuencia (Córdova, Cobos, Imán, & Castro, 2013). Por ello en este experimento se utilizó medio de cultivo semisólido WPM (Woody Plant Medium) suplementado con la auxina 2,4-D a diferentes concentraciones, con base en los mejores resultados obtenidos en las investigaciones revisadas bibliográficamente de cultivo *in vitro* de mortiño. Los tratamientos aplicados se observan en la siguiente tabla:

Tabla 4.

Tratamientos para la inducción de callos a partir de explantes de hoja de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth).

Tratamiento	Concentración de 2,4-D (mg/L)
Control	0
1	0.5
2	2.5
3	4.5

Una vez que se determinó que los explantes de hoja mortiño se encontraban totalmente libres de contaminación luego de los 21 días de siembra, y que el medio de cultivo indujo al desarrollo de callos alrededor del explante, se infirió que los explantes presentaban las condiciones idóneas para ser multiplicados en un medio de cultivo nuevo.

El objetivo de la etapa de multiplicación de los callos fue obtener la mayor cantidad posible a partir de cada explante que previamente se introdujo. Para este fin, cada una de las estructuras de los callos se divide en dos segmentos y se trasplanta a un frasco con medio de cultivo nuevo y fresco (Rodríguez, Latsague, Chacón, & Astorga, 2014).

El medio de cultivo empleado para la multiplicación fue el mismo empleado en la introducción, es decir un medio semisólido WPM suplementado con 2 mg/L de 2,4-D, puesto que tiene el potencial para seguir induciendo el desarrollo de los callos.

A cada explante sembrado dentro de un frasco con el medio de cultivo mencionado, se lo consideró como una unidad experimental para la posterior realización del estudio estadístico. Además, cada tratamiento planteado se realizó por triplicado.

Investigación teórica acerca del aislamiento y purificación de protoplastos en especies vegetales cercanas taxonómicamente al mortiño.

Las investigaciones de aislamiento y purificación de protoplastos en mortiño, no han sido descritas y un porcentaje muy bajo ha sido publicado. Por lo cual, en esta sección se reúnen los procesos realizados en diversos estudios de obtención de protoplastos en plantas del mismo género o familia, incluso de plantas leñosas silvestres similares al mortiño. Cabe recalcar que la aplicación de la técnica de cultivo *in vitro* mencionada busca resolver problemas de propagación

en plantas, como es el caso del mortiño y otros berries, que tienen una alta demanda en el mercado al ser frutos con un alto valor nutricional para el cuidado y control de la salud, además de ser considerados como uno de los cinco alimentos recomendados por la Organización Mundial de la Agricultura y la Alimentación; y cuyos métodos tradicionales no permiten un crecimiento rápido de la planta por lo cual, la tasa de éxito de propagación es baja (Dandan, Wentian, Jiang, & Zhixin, 2011).

Los artículos científicos revisados, son el resultado de la exploración por medio de las plataformas de búsqueda de literatura científica y académica como Google Scholar, Library Genesis y ScienceDirect. Se trató de obtener información actualizada, sin embargo, al haber poco contenido del tema se consideraron las publicaciones de los últimos 10 años. Los sitios web realizan las búsquedas relacionando las palabras que las personas digitan, con las palabras escritas en los artículos, es por esta razón que al utilizar palabras clave como "*Vaccinium floribundum* Kunth", "protoplast isolation" o "ericaceae" aparecían una gran cantidad de resultados. Sin embargo, el discriminante en esta investigación fue que la información fuera de plantas de la misma familia, género o leñosas similares al mortiño, por lo tanto, al filtrar de este modo los contenidos, se obtuvieron finalmente 7 artículos relacionados con la obtención de protoplastos.

De cada uno de estos artículos se extrajo la información relevante acerca del aislamiento y purificación de protoplastos como el tipo de explante a utilizar, origen del explante, enzimas utilizadas para la digestión, cóctel enzimático, porcentajes probados de las enzimas, tiempo de digestión enzimática, pH, reguladores osmóticos, velocidad y tiempo de centrifugación, así como medios de cultivo aplicados en el cultivo *in vitro* de protoplastos.

Adicionalmente, de cada artículo se tomaron los nombres de los autores, el tipo de documento publicado, la revista donde fueron publicados, así como el país donde se realizaron

los ensayos con el fin de tener conocimiento sobre los lugares donde están llevando a cabo este tipo de estudios.

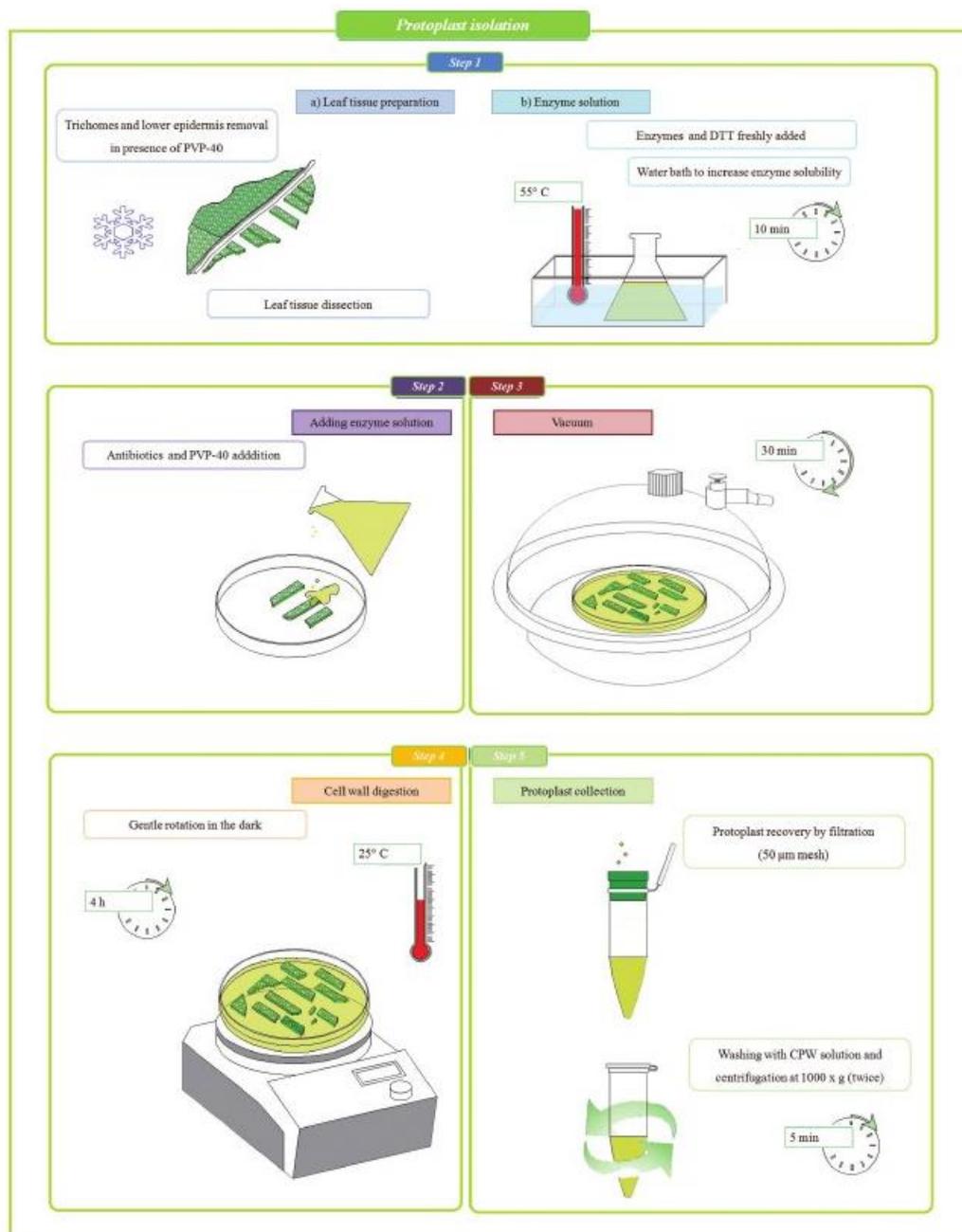
Aislamiento de protoplastos

El objetivo común que tienen los ensayos de aislamiento de protoplastos es determinar tanto la concentración enzimática, así como el tiempo óptimo de exposición a la misma para obtener el mayor número de protoplastos viables, a partir de explantes de hojas o callos establecidos con anterioridad. En la mayoría de estudios se utilizan dos enzimas principales, la celulasa y la pectinasa, que degradan específicamente los componentes celulósico y pectínico de la pared celular. En otros tejidos vegetales también se han utilizado hemicelulasas adicionales para una correcta digestión de la pared (Castro, 2017).

A continuación, se muestra una figura con el procedimiento general para el aislamiento de protoplastos a partir de tejido del mesófilo aplicando una solución enzimática.

Figura 2.

Flujo de trabajo del aislamiento de protoplastos por el método enzimático



Previo al aislamiento de protoplastos, las hojas utilizadas para los ensayos son sometidas a un proceso de esterilización con alcohol entre 75 y 96%, cloruro de mercurio al 0,1% o hipoclorito de sodio como agentes de desinfección, seguidos de lavados con agua estéril; cuando las hojas provenían de un cultivo externo, se considera este tipo de desinfección con la finalidad de eliminar microorganismos que contaminen y provoquen daños dentro del ensayo. En muchas ocasiones, es preferible obtener los explantes de plantas cultivadas *in vitro*, ya que poseen un mayor control de las condiciones de asepsia y, por lo tanto, el método de desinfección puede realizarse con menor rigurosidad, sobre todo para evitar daños severos al explante con la exposición a los agentes químicos.

Para el proceso de aislamiento en algunos estudios se utilizaron cortes de los explantes de aproximadamente 1 centímetro por lado, y en otros primero se retiró la epidermis de las hojas mediante un raspado para luego cortarlas en tiras delgadas. Luego, estos explantes fueron añadidos a la solución enzimática con agitación y en oscuridad; el rango de los porcentajes de cada enzima de la solución fue propuesto de acuerdo a estudios preliminares que han dado resultados satisfactorios en otros genotipos, y con el pasar del tiempo al ir ampliando la técnica en más plantas, se ha notado que estos porcentajes son óptimos para aislamiento de protoplastos vegetales.

El aislamiento se busca alcanzar una densidad óptima de protoplastos que es medida mediante el cálculo de los parámetros de rendimiento y viabilidad. Mientras se lleva a cabo la digestión enzimática, se realiza una observación microscópica para el cálculo del rendimiento y viabilidad de los protoplastos en un intervalo de entre una y cuatro horas hasta completar el tiempo de digestión. Esta observación, desde la primera hora en que las enzimas comienzan a realizar la digestión, permite reconocer el incremento del número de protoplastos conforme transcurre el experimento hasta que la curva de conteo llega a su máximo valor en un momento

determinado, el cual se considera como tiempo óptimo y después de este, tanto el número de protoplastos como su viabilidad va en disminución.

El rendimiento de los protoplastos en la mayoría de estudios fue medido utilizando una placa de recuento de células sanguíneas y aplicando la siguiente fórmula. El valor medio de cada muestra fue tomado por triplicado.

$$\text{Rendimiento } \left(\frac{n}{g \text{ FW}} \right) = \frac{\text{Número de protoplastos en 1 ml de suspensión} * \text{volumen diluido}}{\text{masa foliar total}}$$

Mientras que la viabilidad se determinó mediante la tinción de diacetato de fluoresceína (FDA), y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad de los protoplastos}(\%) = \frac{\text{Número de protoplastos viables} * 100\%}{\text{Número total de protoplastos}}$$

Cuando se desea regenerar plantas completas a partir de protoplastos, el objetivo es crear nuevas variedades mejorando su calidad, por medio del potenciamiento de algunas características como: mantenerse libres de patógenos o la resistencia a condiciones ambientales desfavorables.

Uno de los estudios utilizó los protoplastos de laurel de montaña (*Kalmia latifolia* L.) de las plantas tratadas con la cepa AOK-30 de *Streptomyces padanus*, un actinomiceto con capacidad antifúngica y que también es utilizado como agente de biocontrol; para determinar si el tratamiento brindaba tolerancia a la sequía a las plantas de laurel sembradas *in vitro*.

En esta Ericaceae aislaron los protoplastos de las hojas añadiendo 7.2 mg/ml de xilanasas en la solución enzimática aplicada a plantas que recibieron el tratamiento con el actinomiceto, lo que sugirió que la composición y estructura de las paredes celulares de dichas plantas pudo haber sido modificada por la cepa AOK-30 (Hasegawa, Meguro, Nishimura, & Hitoshi, 2004). Este tipo

de investigaciones denotan la importancia que tiene el estudio de los protoplastos y la información que se puede obtener de los mismos.

Otro ejemplo de la utilidad de los protoplastos se empleó en el madroño (*Arbutus unedo*), que pertenece a la misma familia, Ericaceae; en el cual se llevó a cabo el aislamiento de los protoplastos de las hojas para evaluar la integridad de su ADN en las diferentes estaciones del año (Choury, et al., 2017).

A partir de protoplastos también se puede llevar a cabo la regeneración de plantas completas, como ha sido experimentada en *Arabidopsis thaliana*, una planta perteneciente a la familia Brassicaceae que ha sido tomada como modelo de una gran cantidad de investigaciones científicas debido a su rápido ciclo de vida, una producción de progenie numerosa, a más de que no requiere espacios grandes y su cultivo en invernaderos o cámaras de cultivo es muy fácil. Así también, ha influido que su genoma tiene un tamaño relativamente pequeño y fue secuenciado totalmente en el año 2000 (CSIC, 2018).

Para este objetivo se han obtenido protoplastos de las hojas mientras que, en ensayos diferentes para la obtención de protoplastos de la misma *Arabidopsis thaliana*, se establecieron suspensiones celulares, las cuales consisten en un cultivo líquido estéril donde se encuentran distribuidas células libres y agregados celulares partiendo de callos friables (Codesal, 2016). Por ende, el hecho de que las células ya se encuentren disgregadas facilita la digestión enzimática y hace que el tiempo de digestión sea menor. En muchos estudios relacionados a la liberación de protoplastos, concuerdan en que las mejores fuentes de obtención son los callos y los cultivos en suspensión; siendo los últimos los que liberan mayor cantidad de protoplastos intactos.

Purificación de protoplastos

Posterior al aislamiento, la purificación permite obtener protoplastos libres de agregados y restos de tejido no digerido que se encuentre en la solución, de manera que luego de este proceso se pueda realizar el cultivo de los protoplastos. En esta etapa el factor más importante a considerar es la concentración del regulador osmótico, ya que la eliminación de la pared celular y la pérdida de presión de la pared en el protoplasto causará la fragmentación de la célula, por lo tanto, se debe añadir una cierta dosis de estabilizador osmótico a la solución enzimática para mantener el equilibrio entre el entorno interno y externo del protoplasto (Dandan, Wentian, Jiang, & Zhixin, 2011). Los estudios examinados utilizaron sacarosa y manitol como estandarizadores osmóticos.

Adicionalmente, se tomaron en cuenta las diferentes velocidades y tiempos de centrifugación ya que tienen un efecto significativo en el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos. En este sentido, la efectividad tanto de la velocidad como del tiempo de centrifugación va a variar de acuerdo al genotipo.

Al final de la etapa de purificación todas las investigaciones determinaron nuevamente el rendimiento y la viabilidad protoplásmica con una placa de conteo celular y calcularon sus valores aplicando las fórmulas.

Cultivo de protoplastos

Una vez que el proceso de purificación termina, el cultivo de protoplastos tiene la finalidad de evaluar su viabilidad mediante la comprobación del regeneramiento de la pared

celular y el inicio de la división celular en un medio de cultivo adecuado. El aislamiento de protoplastos de alta calidad es el requisito previo para el cultivo de protoplastos y la hibridación de células somáticas (Tu Yi, Xiong Li, & Leng, 2009). El optimizar las condiciones del aislamiento de protoplastos permite conseguir un alto índice de éxito en el cultivo de protoplastos y posibilita la realización de cruces de células somáticas entre diferentes especies vegetales.

Hasta el momento no se ha informado de resultados del cultivo de protoplastos de especies leñosas de la familia Ericaceae, especialmente especies esclerófilas ya que los estudios desde el aislamiento de protoplastos aún se encuentran en una fase temprana (Choury, et al., 2017). Sucede lo mismo con el mortiño en nuestro país, cuyos estudios apenas han alcanzado la fase de introducción *in vitro* y la inducción a callo que se presenta en este trabajo.

Apenas en 1983, se reportó un trabajo realizado por Smith y McCown (1983) en el cual aislaron protoplastos de dos especies de Ericaceae e intentaron cultivarlos sin éxito. El objetivo de la investigación era comparar la mejor fuente de protoplastos en base a plantas sembradas en invernadero y los cultivos *in vitro* de brotes de dos tipos de *Rhododendron*: Boule de Neige y Gibraltar, cultivados en medio WPM con adición de 2-iP (2-Isopentenil-adenina). Algunos factores que tomaron en cuenta del cultivo *in vitro* fueron el medio de cultivo líquido WPM y la exposición a la luz de los brotes (Norton & Norton, 1989).

Con respecto a las investigaciones realizadas en *Arabidopsis Thaliana*, el cultivo de protoplastos se realizó con una previa incrustación de los mismos en perlas de alginato de sodio, y utilizando los medios de cultivo CM A, CM B y CM C (Tabla 5); renovándolos cada 2 semanas (Damm & Willmitzer, 2008).

Tabla 5.

Medios de cultivo probados para la regeneración de plantas de Arabidopsis thaliana a través de protoplastos.

Medios de cultivo	Medio basal	Modificación añadida	
		Hormonas (mg/L)	
CM A	Glucosa 0.4 M	1 mg/L 2,4-D	0.15 mg/L BAP
CM B	B5 (Gamborg et al. 1968)	1 mg/L 2,4-D	0.50 mg/L BAP
CM C	MII (Li and Kohlenbach, 1982)	0.2 mg/L 2,4-D	1 mg/L KIN

Nota. Tomado de Damm & Willmitzer, 2008.

Capítulo 3

Resultados

Desinfección de explantes

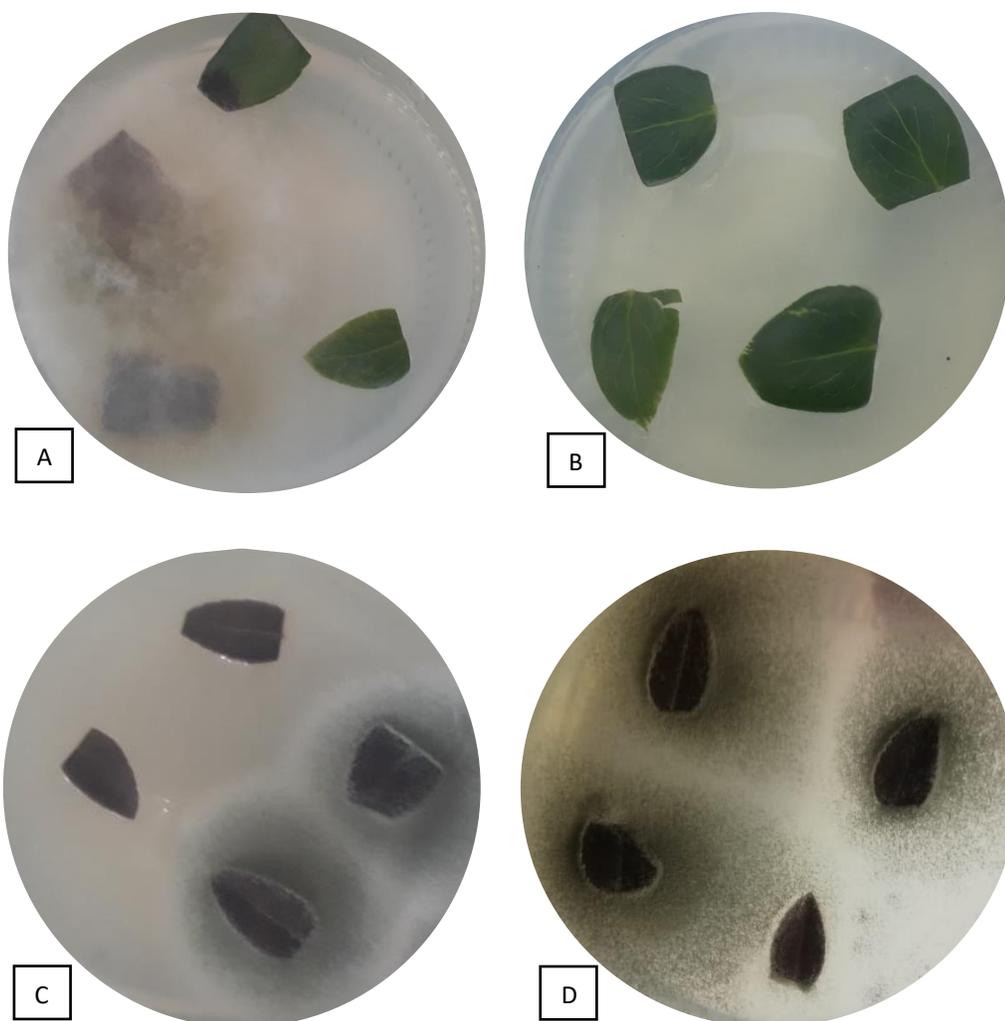
La obtención de callos se logró realizando previamente la desinfección de los explantes de hoja de mortiño, de manera que queden libres de patógenos y puedan responder al tratamiento de inducción a callos. Para esta etapa se consideró como factor principal la concentración de fungicida Skul-27 (0.5, 2 y 4 ml/L) y el tiempo de inmersión en el mismo (5 y 10 minutos), sin embargo, se realizó un protocolo general de desinfección anterior como se muestra en la Tabla 2. Las variables que se analizaron en esta etapa fueron la contaminación por hongo o bacteria y la oxidación de los explantes.

Contaminación

Esta variable fue evaluada al cabo de 21 días de siembra, mediante la observación de la presencia de hongo o bacteria. La unidad experimental para este caso fue cada explante sembrado en los frascos de medio.

Figura 3.

Contaminación observada a los 21 días de siembra en explantes de hoja de mortiño



Nota. Tratamiento 2 (A), tratamiento 3(B), tratamiento 4(C) y tratamiento 6(D).

Análisis de los datos

El conteo de los explantes que presentaban contaminación por hongo, bacteria o que estaban libres de contaminación se presenta a continuación en la tabla:

Tabla 6.

Número de explantes contaminados por hongo o bacteria y explantes sin contaminación.

Tratamientos de desinfección*	Contaminación por hongo	Contaminación por bacteria	Sin contaminación	Total
Control	97	31	7	135
T1	83	33	19	135
T2	75	31	29	135
T3	15	37	83	135
T4	37	38	60	135
T5	38	35	62	135
T6	38	34	63	135

Nota. Los tratamientos de desinfección se detallan en la tabla 3

El tratamiento que tiene el mayor número de explantes sin contaminación es el número 3, en el cual se usó una concentración de Skul-27 de 4 ml/L con un tiempo de inmersión de 5 minutos. Mientras que los dos primeros tratamientos que tenían la menor concentración del fungicida presentan los valores más altos de contaminación especialmente por hongo.

Tabla 7.

Resumen de la prueba ANOVA para determinar diferencias significativas entre los tratamientos de desinfección para la contaminación con hongo.

F.V.	Suma de cuadrados	gL	Media cuadrática	F	p-valor
Modelo	220.46	5	44.09	18.66	<0.0001
Tratamiento	220.46	5	44.09	18.66	<0.0001
Error	198.53	84	2.36		

En este análisis se obtuvo un p-valor menor a 0.1, con un nivel de significancia del 10%, lo que demuestra una diferencia significativa entre los tratamientos de desinfección para la contaminación con hongo.

Tabla 8.

Resumen del Test de Tukey a fin de determinar el tratamiento de desinfección con mayor diferencia para contaminación con hongo.

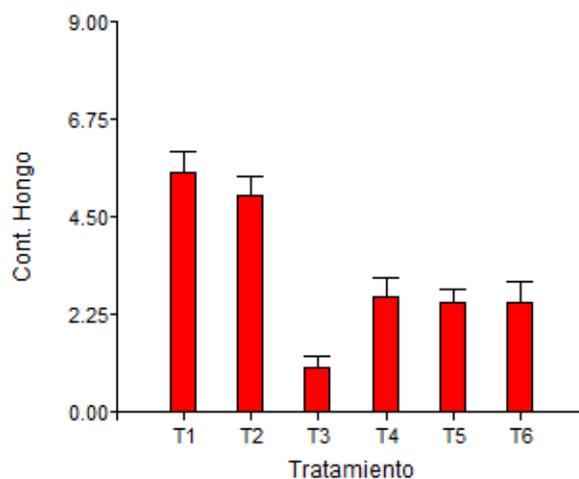
Tratamiento	Medias	Subconjunto
T3	1.00	A
T6	2.53	B
T5	2.53	B
T4	2.67	B
T2	5.00	C
T1	5.53	C

En la tabla del test de Tukey se pudo evidenciar que, de acuerdo al valor de las medias, los tratamientos se dividieron en tres subconjuntos, siendo el que tiene una media de contaminación más baja el tratamiento número 3, resultando ser el más adecuado para la desinfección de los explantes.

La siguiente figura muestra el promedio de explantes contaminados con hongo por cada uno de los tratamientos probados:

Figura 4.

Número de explantes contaminados por hongo



Nota. Número promedio de explantes de hoja de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) contaminados por hongo en cada tratamiento aplicado al cabo de 21 días de siembra.

Tabla 9.

Resumen de la prueba ANOVA para determinar diferencias significativas entre los tratamientos de desinfección para la contaminación con bacteria.

F.V.	Suma de cuadrados	gL	Media cuadrática	F	p-valor
Modelo	2.3	5	0.46	0.12	0.9871
Tratamiento	2.32	5	0.46	0.12	0.9871
Error	319.33	84	3.80		

En este análisis realizado para los tratamientos de desinfección contra contaminación por bacteria, se obtuvo un p-valor mayor a 0.1, con un nivel de significancia del 10%, lo que demuestra que no existen diferencias relevantes al comparar todos tratamientos.

Además, la siguiente tabla del test de Tukey ratifica que no hubo diferencias en los tratamientos dado que sus medias son similares.

Tabla 10.

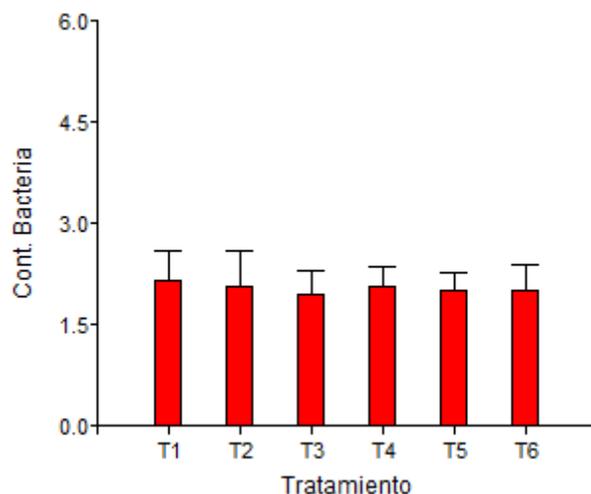
Resumen del Test de Tukey a fin de determinar el tratamiento de desinfección con mayor diferencia para contaminación con bacteria.

Tratamiento	Medias	Subconjunto
T2	2.07	A
T1	2.20	A
T6	2.27	A
T5	2.40	A
T3	2.47	A
T4	2.53	A

Mediante este análisis se pudo evidenciar que, de acuerdo al valor de las medias, los tratamientos permanecen en un solo subconjunto, dado que no tienen diferencia en sus medias y, de acuerdo a su bajo valor, denota que no hubo un nivel elevado de contaminación por bacteria en los explantes sembrados.

Figura 5.

Número de explantes contaminados por bacteria



Nota. Número promedio de explantes de hoja de mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*) contaminados por bacteria en cada tratamiento aplicado al cabo de 21 días de siembra.

La figura muestra que no hubo diferencias muy notorias entre los tratamientos de desinfección para la contaminación con bacterias, además de que ésta fue baja.

Oxidación

Tabla 11.

Resumen de la prueba ANOVA para determinar diferencias significativas entre los tratamientos contra la oxidación de los explantes.

F.V.	Suma de cuadrados	gL	Media cuadrática	F	p-valor
Modelo	153.12	5	30.62	13.71	<0.0001
Tratamiento	153.12	5	30.62	13.71	<0.0001

Error	187.60	84	2.23
-------	--------	----	------

En este análisis, que tuvo un nivel de significancia del 10%, se puede observar un p-valor mucho menor, denotando que existen diferencias relevantes para la oxidación de explantes con cada tratamiento probado.

Tabla 12.

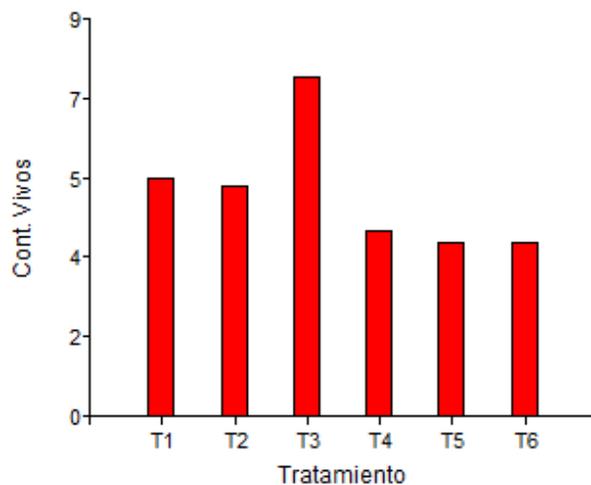
Resumen del Test de Tukey a fin de determinar el tratamiento de desinfección con mayor diferencia en el promedio de explantes vivos.

Tratamiento	Medias	Subconjunto	
T5	3.93	A	
T6	3.93	A	
T4	4.20	A	B
T2	5.20	A	B
T1	5.40		B
T3	7.67		C

El test de Tukey arroja que, debido a las diferencias de medias existentes entre los tratamientos de desinfección, éstos se subdividen en tres subgrupos, dando como resultado que el tratamiento número 3 es el que tiene un mayor promedio de explantes vivos. Por lo tanto, es el mejor tratamiento para los explantes de hoja de mortiño.

Figura 6.

Número de explantes vivos.



Nota. Número promedio de explantes vivos de hoja de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) en cada tratamiento aplicado al cabo de 21 días de siembra.

En la figura se observa claramente que el tratamiento número 3 tiene el mayor número promedio de explantes vivos al cabo de 21 días de siembra.

Introducción y multiplicación de callo

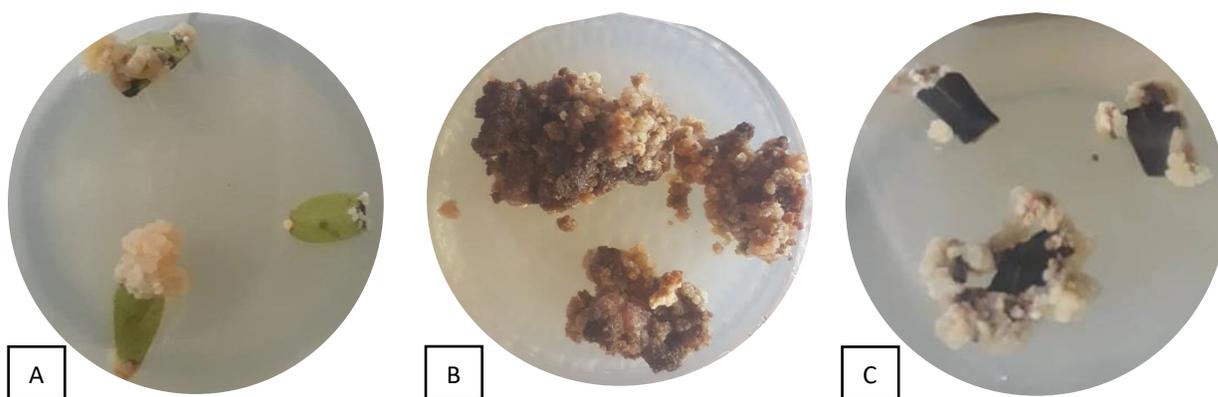
Para este ensayo, en el cual se deseaba inducir a la formación de callos en los explantes de hoja de mortiño, se tomó como factor principal la concentración de auxina 2,4-D (0.5, 2.5 y 4.5 mg/L) en el medio de cultivo semisólido, para el cual además se utilizó el medio WPM y 7.5g/L de agar.

Crecimiento de callos

Se observó la presencia y desarrollo de los callos en los explantes de hoja de mortiño al cabo de 21 días de su siembra.

Figura 7.

Crecimiento de callos



Nota. Crecimiento observado a los 2 días de siembra en explantes de hoja de mortiño. Tratamiento 1 (A), tratamiento 2(B), tratamiento 3(C).

Análisis de los datos

Tabla 13.

Resumen de la prueba ANOVA para determinar diferencias significativas entre los tratamientos para el crecimiento de callo en los explantes.

F.V.	Suma de cuadrados	gL	Media cuadrática	F	p-valor
Modelo	107.24	2	53.62	31.63	<0.0001
Tratamiento	107.24	2	53.62	31.63	<0.0001
Error	71.20	42	1.70		

En este nuevo análisis, con el mismo nivel de significancia del 10%, se puede observar un p-valor mucho menor, lo cual indica que existen diferencias relevantes para el crecimiento de callos a partir de explantes de hoja con cada tratamiento probado.

Tabla 14.

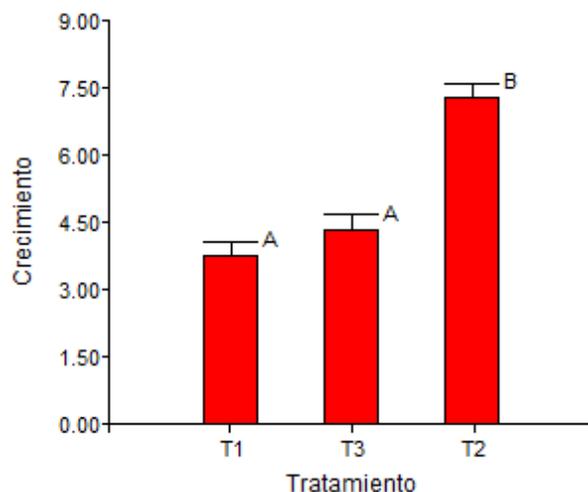
Resumen del Test de Tukey a fin de determinar el tratamiento de inducción a callo con mayor diferencia en el promedio de explantes que presentan crecimiento de callo.

Tratamiento	Medias	Subconjunto
T1	3.93	A
T3	3.93	A
T2	4.20	B

De acuerdo al test de Tukey, la media más alta entre los tratamientos de inducción a callo, fue obtenida por el tratamiento número 2 denotando que, al aplicar este tratamiento a los explantes de hoja, se consiguió el mayor número promedio de explantes con presencia y crecimiento continuo de callo.

Figura 8.

Número de explantes con crecimiento de callo.



Nota. Número promedio de explantes con crecimiento de callo en cada tratamiento aplicado al cabo de 21 días de siembra.

Investigación teórica acerca del aislamiento y purificación de protoplastos en especies vegetales cercanas taxonómicamente al mortiño.

De la búsqueda realizada en las plataformas de la web Google Scholar, Library Genesis y ScienceDirect se pudo obtener 7 artículos de los últimos 10 años sobre obtención de protoplastos en plantas similares al mortiño. Uno de ellos corresponde a arándano, especie del mismo género y familia; los tres siguientes son experimentos en rododendro, laurel de montaña y madroño, pertenecientes a la familia Ericaceae; y los tres artículos científicos restantes se basan en plantas silvestres con características económicas y científicamente importantes, las cuales son: encina, álamo blanco y arabidopsis. Las investigaciones antes mencionadas se llevaron a cabo

principalmente en China e Italia (29%), seguidos de Japón Alemania y Francia (14%) como se muestra a continuación:



La mayor parte de estos estudios se encuentran publicados por la revista Natural Science (4) con los editores Springer y Elsevier; con cuartil Q1.

Aislamiento de protoplastos

En la obtención de los protoplastos, las diferentes concentraciones de enzimas digestivas en la solución, así como el tiempo empleado para la digestión enzimática, tienen una gran influencia en el rendimiento y la viabilidad de los mismos. Tanto la actividad enzimática como el tiempo de digestión van a variar de acuerdo al genotipo y al tipo de explante utilizado en los ensayos (Tabla 15), que en casi todos los estudios (86%) fueron hojas jóvenes, por lo cual el proceso de incubación requiere un estudio riguroso para cada genotipo a estudiar. Una exposición más corta o más larga a la solución enzimática, va a resultar en la disminución de la cantidad de protoplastos intactos obtenida.

Tabla 15.

Tipo y origen del explante utilizado en la obtención de protoplastos de cada especie vegetal analizada.

Fuente bibliográfica	Especie Vegetal	Tipo de explante
(Dandan, Wentian, Jiang, & Zhixin, 2011).	<i>Vaccinium uliginosum</i> L.	Hojas de plantas cultivadas en invernadero
(Tu Yi, Xiong Li & Leng, 2009)	<i>Rhododendron</i> spp.	Hojas de plantas cultivadas <i>in vitro</i>
(Hasegawa, Meguro, Nishimura, & Hitoshi, 2004)	<i>Kalmia latifolia</i> L.	Hojas de plantas cultivadas <i>in vitro</i>
(Choury, et al., 2017)	<i>Arbutus unedo</i>	Hojas de plantas silvestres
(Kuzminsky et al., 2016)	<i>Quercus ilex</i> L. <i>Populus alba</i> L.	Hojas de plantas silvestres
(Damm & Willmitzer, 2008)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hojas de plantas cultivadas en invernadero
(Schirawski, Planchais, & Haenni, 1999)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Suspensiones celulares

Efecto de la concentración enzimática en la obtención de protoplastos.

En todos los ensayos (100%) la celulasa fue utilizada dentro del cóctel enzimático; tres de ellos (43%) añadieron pectinasa, y en uno de estos también se adicionó hemicelulasa; mientras que en los cuatro estudios restantes (57%) combinaron la celulasa con macerozima y en uno añadieron xilanas para hojas envejecidas por la época del año.

Los mejores resultados bibliográficos en las investigaciones de aislamiento de protoplastos muestran que fueron obtenidos utilizando en el coctel enzimático 2,0% de celulasa, en todos los ensayos, en tres de los estudios combinaron con pectinasa al 1%, mientras que en cuatro de ellos usaron macerozima al 1%. Complementariamente, notaron que la adición de hemicelulasa en los protoplastos de arándano disminuyó la viabilidad de los protoplastos. Además, los investigadores notaron que el rendimiento de los protoplastos disminuía cuando la

concentración de celulasa era mayor al 3%, lo que podría deberse a un efecto tóxico de la enzima (Tu Yi, Xiong Li, & Leng, 2009).

Influencia del tiempo de digestión enzimática en el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos.

Los estudios empleados en análisis bibliográfico demostraron que, al concluir las observaciones microscópicas realizadas en cada intervalo de tiempo, el rendimiento de los protoplastos se distribuía normalmente, sin embargo, la actividad protoplasmática tendía a disminuir con el aumento del tiempo de digestión, debido a la ruptura de la membrana del protoplasto. Entonces, el tiempo de digestión óptimo para el aislamiento de los protoplastos varía en cada genotipo, sin embargo, puede observarse que en cuatro estudios (57%) este tiempo sobrepasa las 11 horas. Además, es importante mencionar que, para tener una digestión enzimática exitosa la incubación de los explantes junto con la solución enzimática debe combinarse con agitación constante.

En cuanto a *Arabidopsis thaliana*, las diferencias en el rendimiento de los protoplastos radican en la fuente de obtención de protoplastos, ya que cuando se utilizaron hojas el tiempo de digestión enzimática fue mucho mayor que cuando se tomaron suspensiones celulares para el ensayo de aislamiento.

Efecto del pH en el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos.

Los investigadores de los artículos consultados pudieron observar que un valor de pH demasiado alto o demasiado bajo de la solución enzimática afecta directamente a la actividad de la enzima, el análisis microscópico de las muestras tomadas a diferentes valores de pH, en cuatro

estudios (57%), mostró que el rendimiento de los protoplastos era mayor cuando el valor de pH era de 5.8 y su viabilidad era mejor; mientras que en los otros tres artículos (43%) su pH óptimo fue de 5 (Tabla 16).

Sin embargo, una de las investigaciones menciona que una vez concluida la digestión, el valor del pH de la solución enzimática tiende a disminuir, lo que podría deberse al efecto de los productos liberados en la digestión enzimática, afectando a la actividad de los protoplastos.

Tabla 16.

Cóctel enzimático, tiempo de digestión enzimática y pH utilizado en la obtención de protoplastos de cada especie vegetal.

Fuente bibliográfica	Especie Vegetal	Coctel enzimático		pH	Tiempo de digestión enzimática	Factores calculados
		Enzimas	Concentración			
(Dandan, Wentian, Jiang, & Zhixin, 2011).	<i>Vaccinium uliginosum</i> L.	Celulasa R-10	1% a 2.5%	5.8	8 horas	
		Pectinas a Y-23	0% a 1.0%			
		Hemicelulasa	0.2% a 1.5%			
(Tu Yi, Xiong Li & Leng, 2009)	<i>Rhododendron</i> spp.	Celulasa R-10	1%, 2% y 3%	5.0	14 horas	
		Pectinas a Y-23	0.5%, 1% y 2%	5.5 y 6.0		
(Hasegawa, Meguro, Nishimura, & Hitoshi, 2004)	<i>Kalmia latifolia</i> L.	Celulasa R-10	2%	5 a 6	15 horas	Rendimiento y viabilidad
		Macerozima	1%			
		Xilanasa	7.2 mg/ml			
(Choury, et al., 2017)	<i>Arbutus unedo</i>	Celulasa R-10	2% y 4%	5	16 horas	
		Macerozima	1%			
(Kuzminsky et al., 2016)	<i>Quercus ilex</i> L.	Celulasa Onozuka RS	2%	5	4 horas	
		Macerozima				
	<i>Populus alba</i> L.	Onozuka RS	1%			

(Damm & Willmitzer, 2008)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Celulasa R-10 Macerozima	1% 0.25%	5.5	18 horas
(Schirawski, Planchais, & Haenni, 1999)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Celulasa Pectoliasa	20 g/L 1 g/L	5.8	1 hora

Los valores óptimos de cada enzima del cóctel, el tiempo de digestión y el pH empleado en cada especie vegetal se determinó a partir del mejor rendimiento y la mayor tasa de viabilidad calculada en los protoplastos obtenidos, a continuación, se muestra una tabla con los valores respectivos de rendimiento y viabilidad:

Tabla 17.

Valores de rendimiento y viabilidad calculados en cada especie vegetal analizada.

Fuente bibliográfica	Especie Vegetal	Rendimiento (10 ⁶ n/g FW)	Viabilidad (%)
(Dandan, Wentian, Jiang, & Zhixin, 2011).	<i>Vaccinium uliginosum</i> L.	15.86	75
(Tu Yi, Xiong Li & Leng, 2009)	<i>Rhododendron</i> spp.	1.47	79
(Hasegawa, Meguro, Nishimura, & Hitoshi, 2004)	<i>Kalmia latifolia</i> L.	10 a 20	60
(Choury, et al., 2017)	<i>Arbutus unedo</i>	61.3	100
(Kuzminsky et al., 2016)	<i>Quercus ilex</i> L.	61.5	67
(Kuzminsky et al., 2016)	<i>Populus alba</i> L.	45.7	85
(Damm & Willmitzer, 2008)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.7 a 1.1	80
(Schirawski, Planchais, & Haenni, 1999)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5	86

Purificación de protoplastos

Efecto de la concentración del estabilizador de estrés osmótico en el rendimiento de los protoplastos.

La fragmentación de la célula será causada por la eliminación de la pared celular y causará la pérdida de presión de la pared en el protoplasma, por lo tanto, se debe añadir una cierta dosis de estabilizador osmótico a la solución enzimática y a los reactivos relacionados para mantener el equilibrio osmótico entre el entorno interno y externo del protoplasma, si no se hace de esta manera, la célula puede estallar o alterar su estructura interna (Dandan, Wentian, Jiang, & Zhixin, 2011). Con esta base, pudieron determinar que la cantidad precisa de estabilizador osmótico, para la purificación de los protoplastos de arándano fue de 0.60 mol/L de manitol.

En tanto que, los protoplastos de rododendro fueron purificados con un estabilizador osmótico diferente, siendo esta la sacarosa en un porcentaje óptimo del 21% (Tu Yi, Xiong Li, & Leng, 2009). En el caso del laurel de montaña se utilizó, al igual que en el arándano, manitol como estabilizador osmótico a una concentración 1M (Hasegawa, Meguro, Nishimura, & Hitoshi, 2004).

Tabla 18.

Regulador osmótico utilizado en el proceso de purificación de protoplastos de cada especie vegetal analizada.

Fuente bibliográfica	Especie Vegetal	Regulador osmótico	Concentración
(Dandan, Wentian, Jiang, & Zhixin, 2011).	<i>Vaccinium uliginosum</i> L.	Sacarosa	20%
		Manitol	0.8 M
(Tu Yi, Xiong Li & Leng, 2009)	<i>Rhododendron</i> spp.	Manitol	0.9 M

(Hasegawa, Meguro, Nishimura, & Hitoshi, 2004)	<i>Kalmia latifolia</i> L.	Manitol	1 M
(Choury, et al., 2017)	<i>Arbutus unedo</i>	Manitol	0.8 M
(Kuzminsky et al., 2016)	<i>Quercus ilex</i> L.	Manitol	0.6 M
	<i>Populus alba</i> L.		
(Damm & Willmitzer, 2008)	<i>Arabidopsis</i>	Manitol	0.4 M
	<i>thaliana</i>		
(Schirawski, Planchais, & Haenni, 1999)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Manitol	0.25

Efectos de la velocidad y el tiempo de centrifugación en la purificación de los protoplastos.

Los diferentes estudios revisados bibliográficamente determinaron que el rendimiento de los protoplastos aumenta a medida que la velocidad de centrifugación se eleva, pero después este rendimiento disminuye; mientras que la viabilidad reduce significativamente a medida que la velocidad de centrifugación supera las 1000 rpm.

Los dos primeros ensayos obtuvieron protoplastos con una centrifugación de 1000 rpm durante 6 minutos; los restantes muestran una velocidad de 210 x *g* durante 5 minutos, que es equivalente a las revoluciones aplicadas en arándano y rododendro. Por lo tanto, se puede notar que existe una igualdad en estos dos parámetros de los ensayos, sugiriendo que podrían ser efectivos para la obtención y purificación de protoplastos de mortiño.

Tabla 19.

Velocidad y tiempo de centrifugación aplicada para la purificación de protoplastos en cada especie vegetal analizada.

Fuente bibliográfica	Especie Vegetal	Velocidad de centrifugación	Tiempo de centrifugación (min)
(Dandan, Wentian, Jiang, & Zhixin, 2011).	<i>Vaccinium uliginosum</i> L.	1000 rpm	6
(Tu Yi, Xiong Li & Leng, 2009)	<i>Rhododendron</i> spp.	1000 rpm	6
(Hasegawa, Meguro, Nishimura, & Hitoshi, 2004)	<i>Kalmia latifolia</i> L.	210 x g	5
(Choury, et al., 2017)	<i>Arbutus unedo</i>	1000 x g	5
(Kuzminsky et al., 2016)	<i>Quercus ilex</i> L.	1000 x g	5
	<i>Populus alba</i> L.	1000 x g	5
(Damm & Willmitzer, 2008)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	60 x g	5
(Schirawski, Planchais, & Haenni, 1999)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	80 x g	5

Dentro de las condiciones óptimas de centrifugación para la purificación de los protoplastos, se considera la velocidad de centrifugación de 1000 rpm durante un tiempo de 6 minutos.

Cultivo de protoplastos.

Al ser los primeros experimentos de aislamiento y purificación realizados, tanto en arándano como en rododendro, todavía no existe experimentación relacionada al cultivo de los protoplastos. Dentro de la bibliografía recopilada, el resultado de cultivo de protoplastos de rododendro mostró poca eficacia luego de aislar protoplastos, si bien la formación de la pared celular comenzó 2 o 3 días después del cultivo, la viabilidad había disminuido al 68% en el

rododendro Bola de Nieve y al 0% en Gibraltar siete días después de la implantación. Finalmente, no hubo ningún porcentaje de éxito en el cultivo de estos protoplastos (Smith & McCown, 1983).

El cultivo de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* dio resultados satisfactorios, por tanto, se podría probar la replicación de la técnica en protoplastos de mortiño. En primer lugar, el procedimiento de incrustación en alginato de sodio dejó más del 70% de los protoplastos intactos durante el revestimiento, a más de que el uso de alginato de sodio como agente gelificante fue absolutamente necesario para obtener altas frecuencias de división inicial. Notaron también que, las altas frecuencias de división, sólo se obtenían cuando se colocaba una densidad inicial de $2-3 \times 10^5$ protoplastos/ml. Los medios probados, CM A, CM B o CM C, no difirieron significativamente en sus efectos sobre el desarrollo continuo de las colonias. Después de 5 a 7 semanas las colonias fueron liberadas de la matriz de alginato por despolimerización (Damm & Willmitzer, 2008).

Capítulo 4

Discusión

Desinfección de explantes

Cuando se pretende establecer un cultivo *in vitro*, ya sea a partir de órganos, células o protoplastos se debe tener en cuenta los siguientes aspectos que tienen una influencia directa en el proceso: el tipo de explante, técnicas de asepsia, medios de cultivo a emplear y las condiciones de incubación (temperatura, luz, humedad). De esta manera, el primer paso para establecer el cultivo *in vitro* de la hoja de mortiño, fue definir la asepsia tanto del explante como del entorno en el que se llevó a cabo el experimento (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010).

En medida de lo posible, es mejor si el explante proviene de plantas cultivadas *in vitro* o que han recibido un control fitosanitario dentro de un invernadero, esto reduce drásticamente las posibilidades de contaminación, sin embargo, al ser el mortiño una planta silvestre que crece en los páramos a bajas temperaturas no fue posible adaptarlo a las condiciones de laboratorio. Así mismo, es importante evitar el uso de explantes como raíces o rizomas que provienen de la tierra de una maceta o del campo, ya que estos pueden contener mayor cantidad de microorganismos que no puedan ser eliminados con el tratamiento de desinfección (Rodríguez & Torres, 2018).

Contaminación

Como menciona Lostaunau (2015), existen dos fuentes de contaminación dentro del cultivo *in vitro*, la primera se trata de los microorganismos endógenos o aquellos que se encuentran en la superficie del explante; y la segunda fuente proviene del mal manejo que pueda tenerse en los procedimientos de cultivo dentro del laboratorio por parte del operador. Inicialmente en el mortuño fue fácil identificar que la fuente primaria de contaminación era por hongo endógeno, debido a que en el terreno donde se recolectó el material vegetal los hongos crecían de manera simultánea alrededor de las plantas de mortuño. Lo que puede estar asociado también, a la época del año en que se recolectaron las muestras de la planta porque como lo menciona Levitus, et al. (2010), este factor tiene influencia en la mayor o menor proliferación de microorganismos, y en este caso fue temporada de lluvias, época cuando el crecimiento de hongos de la zona aumenta.

Algunas poblaciones de microorganismos tienen la capacidad de permanecer dentro de las células vegetales, en espacios intercelulares o interiormente en aseos conductores y de esta manera quedan resguardados ante los efectos de los agentes químicos. Es de esta forma que pueden introducirse en el cultivo *in vitro* y propagarse junto con el material vegetal manifestándose después de un tiempo (Hernández & González, 2010).

Una vez analizados estos aspectos, para este ensayo primero se realizó una desinfección general a los explantes de hojas de mortuño de las cuales se deseaba obtener callos, la desinfección de la superficie del explante empezó con un lavado con agua corriente y luego se utilizó etanol 70% por 3 minutos, detergente al 2% durante 10 minutos e hipoclorito de sodio al 2.5% por 5 minutos para destruir los microorganismos de tal forma que el daño al explante sea

mínimo, y finalmente para eliminar restos de estos productos químicos se realizaron varios enjuagues con agua estéril (Trujillo, 2009).

En experimentos previos, fue notoria la presencia de hongo en el medio de cultivo donde se colocaron explantes de hoja de mortiño, incluso se pudo observar que el hongo crecía desde el explante por lo cual se intuyó que se trataba de un hongo endófito. Alburqueque & Gusqui (2018), mencionan que el hongo puede hospedarse en las semillas, hojas, frutos o estar en las malezas cercanas al cultivo de interés. En muchos casos este tipo de microorganismos no causan daño al cultivo *in vitro* en sí, pero establecen una competencia con el explante por los nutrientes que concentra el medio de cultivo o lo modifican (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010).

En el campo de agricultura, existen un sin número de plagas que deterioran y matan a los cultivos de especies vegetales de gran importancia económica, causando pérdidas millonarias. Los hongos son uno de los agentes principales que causan dichas plagas, para combatir las enfermedades fúngicas en plantas, el hombre ha desarrollado fungicidas que ayudan a que la tasa de producción no se vea afectada por los hongos (Gómez & Núñez, 2019). Uno de los principios activos en los fungicidas más utilizados es el sulfato de cobre pentahidratado, cuya acción es preventiva, contiene un 5.5% de cobre metálico y tiene un amplio espectro de acción. Razón por la cual se escogió el fungicida Skul-27 que contiene dicho principio activo, para el control del hongo que afectaba el cultivo *in vitro* de los explantes de hoja de mortiño.

Varios ensayos *in vitro* aplican el fungicida Skul-27 para estudiar su efecto directo en hongos, utilizando cantidades entre 1 y 3 ml/L; un ejemplo de aquello es la investigación realizada por Gómez & Núñez (2019), en la cual utilizan una dosis de 2.5 ml/L del fungicida para inhibir el crecimiento de *Alternaria*, un hongo que afecta al tomate (*Solanum lycopersicum* L.). En el caso

de esta experimentación llevada a cabo en mortiño, de los 6 tratamientos aplicados (tabla 3) el que arrojó un mejor resultado fue el tratamiento 3 con una concentración de 4 ml/L de Skul – 27 durante 5 minutos de exposición. Este requerimiento de una mayor concentración de fungicida puede deberse a que el mortiño es una planta silvestre que convive con el hongo, haciéndose más complicada su introducción *in vitro* al tratar de eliminar el hongo, además que, seguramente ha desarrollado cierta resistencia frente a este patógeno.

Sin embargo, a la vista se puede notar en las plantas de mortiño, que muchas de sus hojas presentan manchas en forma de pequeños puntos negros, lo cual es un indicador de enfermedad causada por el hongo (Gómez & Núñez, 2019). Pero dado que el crecimiento del mortiño en el páramo es espontáneo, no existe un seguimiento de su tasa de producción la misma que podría mejorar si se aplicara este tipo de fungicidas en el campo con una tecnificación del cultivo en su ambiente natural.

La disminución del nivel de contaminación por hongo que se evidenció en el cultivo *in vitro* de los explantes de hoja de mortiño, está vinculada a que el sulfato de cobre pentahidratado inhibe la germinación de esporas a la vez que actúa disminuyendo la biosíntesis de proteínas en los hongos (Alburquerque & Gusqui, 2018).

Oxidación.

Aquellos explantes que no logran responder de manera positiva al tratamiento de cultivo *in vitro*, tienden a tomar un color café de manera progresiva. Esto se debe a que, cuando se provoca una herida en los tejidos, estos liberan compuestos fenólicos que producen la oxidación del explante (Trujillo, 2009). Una vez que se introdujeron los explantes de hoja de mortiño al

medio de cultivo, se visualizaron diferentes porcentajes de necrosamiento con el paso del tiempo, algunos contaminados y otros simplemente sin respuesta al tratamiento de inducción a callo. Y se corrobora lo mencionado por Borges (2004), quien indica que al acumularse sustancias fenólicas que fueron liberadas por el explante al medio de cultivo, causan frecuentemente inhibición del crecimiento y son parte de los problemas más habituales en la micropropagación.

A medida que pasaban los días, varios explantes que presentaban necrosamiento murieron paulatinamente, lo que también podría deberse al efecto fitotóxico causado por el hipoclorito de sodio (Borges, 2004). Sin embargo, se descarta esta posibilidad ya que en todos los tratamientos se utilizó un bajo porcentaje de hipoclorito de sodio, 2.5% durante 5 minutos. Lo que sí podría tomarse en cuenta es el efecto fitotóxico del fungicida Skul-27, pues en los tratamientos donde se utilizó una mayor concentración al doble de tiempo se observó una mayor tasa de necrosamiento de los explantes. Resultando como tratamiento adecuado, el número 3 en el que se aplicó 4 ml/L Skul-27 durante 5 minutos, tiempo de exposición justo para no dañar los explantes de hoja de mortiño, permitir su supervivencia y establecimiento en el medio de cultivo.

De modo similar, el tamaño del explante es otro parámetro que influye en la supervivencia del mismo, ya que un explante muy pequeño puede ser destruido rápidamente por los productos que se usen en la fase de desinfección, o un explante muy grande no podrá ser desinfectado en su totalidad aumentando las probabilidades de contaminación con microorganismos. Por consiguiente, las hojas de mortiño fueron cortadas en cuadrados de aproximadamente 1 cm². A su vez, la irregularidad de la superficie del explante, puede dar cabida al depósito de patógenos afectando el éxito del tratamiento de desinfección (Hernández & González, 2010).

Introducción y multiplicación de callos

Siendo el mortiño una planta de interés por los componentes antioxidantes y antiinflamatorios que se concentran en su fruto, la obtención de callos a partir de explantes de hoja es una base de la cual se puede continuar aplicando técnicas de cultivo *in vitro* para lograr mejorar la calidad del cultivo y, por ende, del fruto. La embriogénesis somática, en especies leñosas, es un camino eficaz para regenerar nuevas plantas; los callos son una fuente importante para su propagación y mejora genética, en el sentido de que se pueden aislar protoplastos de estos callos, los mismos que darán paso a la hibridación somática mediante una fusión (Hernández & González, 2010).

Cuando se busca inducir a la formación de callos, como en la actual investigación, lo ideal es introducir los explantes más jóvenes, de los que se obtienen respuestas rápidas del tratamiento aplicado, generalmente no tienen mayores problemas de contaminación con microorganismos y la micropropagación tiende a aumentar sus posibilidades de éxito (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010). Es así que, se utilizaron las hojas más jóvenes de las ramas de mortiño recolectadas, que se encontraban en la parte superior de la planta. Conjuntamente, se brindó al explante las condiciones ambientales apropiadas de temperatura, humedad y luz que sumadas a los requerimientos nutricionales acarrearán al explante a la formación de la masa de células amorfas a la que se llama callo (Calva & Pérez, 2005).

Los reguladores de crecimiento que se añaden al medio de cultivo tienen efectos significativos en la respiración celular, la demanda de azúcares y en el proceso de división celular. Se dice que indirectamente inducen a cambios en el metabolismo de las plantas que crecen *in vitro*. Según los estudios, el 2,4-D es capaz de inducir a desdiferenciación y provocar un aumento de la transcripción (Svabova & Lebeda, 2005). De hecho, para inducir y mantener la formación de

callos, como en este caso del mortiño, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es la auxina más empleada en los medios de cultivo teniendo en cuenta que suprime fuertemente la organogénesis (Calva & Pérez, 2005).

Al utilizar 2,4-D para la formación de callo a partir de hojas de mortiño, se obtuvo excelentes resultados; el mejor tratamiento resultó con una concentración de 2.5 mg/L de 2,4-D añadida en el medio semisólido WPM. En el estudio de introducción *in vitro* de mortiño realizado por Trujillo (2009), obtuvieron callo utilizando el mismo medio semisólido más una combinación de 2, 4 y 6 mg/L de KIN (kinetina) en combinación con 0.1 a 5 mg/L de 2,4-D. Cuando la concentración de 2,4-D era mayor a 1 mg/L notaron que los callos eran de color de café, al igual que los callos obtenidos en esta investigación.

Castro, 2017; Calva y Pérez, 2005; Hine & Abdelnour, 2013 concuerdan que la suplementación del medio de cultivo con la combinación de una auxina y una citoquinina induce a la formación de callo, tal como lo hizo Trujillo (2009), al igual que Córdova et al. (2014) quienes afirman que la inducción de callos en explantes se da en medios con una proporción alta de auxina:citoquinina. Sin embargo, se pudo notar que para la producción de callos a partir de hojas de mortiño no fue necesaria la aplicación de una citoquinina, siendo exitosa la adición solo de la auxina 2,4-D en el medio de cultivo. Esta diferencia se debe a que las auxinas son transportadas del medio directamente a las células blanco, por medio del modelo quimiosmótico de transporte polar de las auxinas propuesto por Taiz y Zieger (1998), cuyo efecto es la dilatación de la célula por la presión del agua en el interior de la vacuola, de manera que sigue agrandándose hasta que la pared contrapone resistencia.

Las condiciones físicas para mantener la inducción de callos, son similares a las de un cultivo *in vitro*, la temperatura oscila entre los 25 y 28°C, pero en este caso se mantuvo a 21°C

dadas las bajas temperaturas en las que vive la planta en su ambiente natural; la oscuridad ayuda en las primeras fases de división celular y, en el caso de haber regeneración de nuevas plantas, pueden cambiarse a luz entre 0 a 12,000 lux (Calva & Pérez, 2005).

Investigación teórica acerca del aislamiento y purificación de protoplastos en especies vegetales cercanas taxonómicamente al mortiño.

Aislamiento de protoplastos

En condiciones normales, la fusión de células vegetales se encuentra impedida por la pared que presentan, por esta razón, para obtener plantas híbridas se debe realizar el aislamiento de protoplastos previamente, por medio de una digestión enzimática de la pared celular. Esto quiere decir, que la acción individual o en combinación de ciertas enzimas va a dar como resultado la eliminación de la pared de las células vegetales, convirtiéndolas en lo que llamamos protoplastos (Polci & Friedrich, 2010). Tal como se vio en estudios analizados, sobresale la utilización de las enzimas en combinación para lograr la obtención de protoplastos viables.

Del aislamiento dependerá que el cultivo sea apropiado a su vez para la fusión de protoplastos, y dicha tecnología permitirá mejorar la creación de variedades superiores a través de la hibridación de células somáticas (Xing, Shen, & Zhao, 2006). La fusión de protoplastos permite transferir cualidades deseables de las plantas madre, tales como, la resistencia a enfermedades causadas por virus, hongos o bacterias; a los factores de estrés bióticos o abióticos; incluso entre los genotipos que no han logrado ser hibridados de manera tradicional (Navrátilová, 2004). Llevando este concepto al mortiño, una fusión con una especie de su mismo género como

es el arándano, de alto interés económico, permitiría mejorar su propagación, liberarlo de agentes patológicos y elevar la calidad de su fruto. Es por tal motivo, que se analizaron los protocolos que podrían aplicarse en el aislamiento y purificación de los protoplastos de mortiño a partir de callos de hojas.

Dada su influencia positiva en el éxito del proceso de aislamiento, existen dos fuentes tradicionales que se utilizan para el aislamiento de protoplastos, la primera es de los mesófilos de las hojas y la segunda son las suspensiones celulares. Mediante la revisión bibliográfica se notó que, en la mayoría de especies vegetales utilizaron el mesófilo de las hojas para la obtención de protoplastos, teniendo importantes resultados positivos. Uno de los beneficios de tomar hojas como material vegetal de partida, es que se necesita muy poca cantidad de tejido para alcanzar una densidad alta de protoplastos y de buena calidad. Otro beneficio es que el muestreo de este tejido no destruye a la planta donadora. A su vez existen otros tejidos como los ápices, raíces, incluso granos de polen de los cuales también se pueden extraer protoplastos (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010).

Por su parte, las suspensiones celulares al ser heterogéneas y estar compuestas de agregados de distintos tamaños y células libres, las células en su totalidad no presentan las condiciones óptimas para liberar protoplastos idóneos. Por lo cual, mucho dependerá de las condiciones de crecimiento de las células para la obtención de protoplastos. El rendimiento del proceso de liberación de protoplastos puede aumentar significativamente, como se observó en la investigación de *Arabidopsis thaliana*, cuando se utilizan agregados de células meristemáticas, ya que estas células se encuentran en división activa (Poot & Hernández, 2013). Dado que no se han realizado estudios experimentales con suspensiones celulares de mortiño, este método podría ser probado ya que al haber obtenido callos a partir de las hojas (figura 8), se pueden establecer las

suspensiones; además, a partir de una comparación entre estas dos fuentes primarias se daría a conocer cuál es la mejor para obtener una alta cantidad de protoplastos factibles.

Efecto de la concentración enzimática en la obtención de protoplastos.

Comúnmente las enzimas pectinasa, hemicelulasa y celulasa son las más utilizadas para la digestión de la pared celular debido a que, la actividad de las celulasas y pectinasas hace posible la eliminación de la pared celular de celulosa de las células vegetales obteniendo protoplastos esféricos (Blackhall, M.R, & Power, 1994).

La aplicación de un cóctel con dichas enzimas, se ha convertido en un método general para el aislamiento de protoplastos, sin embargo, se deben realizar modificaciones en cuanto a su combinación y concentración para cada especie vegetal. Esto se pudo notar en los protocolos de los artículos mostrados en la bibliografía consultada, a pesar de haber plantas de la misma familia, como el arándano, rododendro y laurel de montaña; se requieren diferentes porcentajes de enzimas, así también como para las demás plantas en las que se ha realizado este ensayo. La similitud que se evidencia en los ensayos de dicha bibliografía, entre las especies de Ericaceae, es la aplicación de celulasa al 2% y la mitad de ese porcentaje para pectinasa; y en el caso de laurel de montaña, macerozima.

Aunque el aumento de la concentración enzimática en la solución puede incrementar el rendimiento de los protoplastos, este también puede disminuir la viabilidad de los mismos, por lo que debe evitarse la combinación de una alta concentración de enzimas con un tiempo corto de digestión, o la baja concentración con un tiempo extenso (Dandan, Wentian, Jiang, & Zhixin, 2011).

Si las cantidades aplicadas de enzimas fueran más altas se podría dañar a la membrana plasmática de las células, lo que disminuiría la cantidad de protoplastos obtenidos. Conjuntamente, se fija la cantidad de enzimas a aplicar de acuerdo al grosor de la pared celular, de modo que, dependiendo de la especie vegetal, si la pared es más gruesa se necesitará un mayor porcentaje de las enzimas para poder ser digerida (Castro, 2017).

Un segundo aspecto que se ha notado de la revisión bibliográfica, es que el mecanismo más usado para aislar protoplastos de hojas, consiste primero en cortarlas en pedazos más pequeños, o molerlas un poco para aflojar previamente el tejido con el fin de liberar las células, y luego colocar la mezcla de enzimas. No obstante, existe otro mecanismo por el cual se liberan las células del tejido con la ayuda de preparaciones enzimáticas comerciales, las más empleadas son las de macerozima y macerasa; y en un segundo paso se colocan celulasas para diluir la pared celular (Navrátilová, 2004).

El número de protoplastos y la viabilidad que han logrado obtener en las investigaciones de la revisión bibliográfica, está estrechamente relacionada con la proporción del tejido vegetal a emplear y el volumen de la solución enzimática; en vista de que, si la cantidad de tejido es mayor el número de sitios activos sobre los cuales actúen las enzimas aumentará, y esto provocaría que la actividad de las enzimas disminuya afectando negativamente al rendimiento de los protoplastos. Así mismo, el movimiento y la leve agitación de la mezcla durante la acción enzimática aumenta el número de protoplastos aislados (Dědičová, 1995).

Las combinaciones que han planteado los estudios revisados (Tabla 16), apuntan a que se obtendrían buenos resultados de purificación de protoplastos de mortiño, con un porcentaje del 2% de celulasa con la combinación de pectinasa y/o macerozima en menor cantidad.

Influencia del tiempo de digestión enzimática en el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos.

La variación del periodo de acción de la solución enzimática puede clasificarse en dos lapsos: de 2 a 6 horas se considera una acción a corto plazo; y de 16 a 24 horas una acción lenta o a largo plazo. Todo dependerá del genotipo del material vegetal y las condiciones en las que se haya desarrollado, aun así, si se deja actuar durante un tiempo prolongado a la solución enzimática sobre el tejido, la viabilidad de los protoplastos disminuirá llegando a afectar hasta la etapa del cultivo (Castro, 2017).

Lo mencionado se demuestra en los casos de estudio; en el arándano los investigadores notaron que después de 8 horas de digestión enzimática el rendimiento de los protoplastos disminuía porque la membrana de los mismos se rompía; mientras que en el rododendro luego de 14 horas había poca presencia de protoplastos viables y lo mismo pasaba para el laurel de montaña. En general, los ensayos obtuvieron protoplastos pasadas las 15 horas de digestión enzimática. De acuerdo al cóctel enzimático, este puede empezar a actuar sobre las células vegetales, a partir de la media hora hasta después de un día y medio; pero todo dependerá de la planta con la que se trabaje (Arcos, 2010).

Efecto del pH en el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos.

Todos los estudios que se presentaron en esta investigación, y otros realizados en especies de importancia como el trigo (Arcos, 2010), tomate riñón (Castro, 2017) y naranjo (Jadán, 2000) manejan un pH del medio de 5.7 o 5.8, esto se debe a que este valor es el adecuado para

que las enzimas que se encuentran en combinación puedan trabajar en condiciones óptimas, ya que un valor por debajo o por encima de este podría desestabilizar a las enzimas inactivando su función o desnaturalizándolas (Dandan, Wentian, Jiang, & Zhixin, 2011).

Dentro de los estudios analizados en el presente trabajo, el rendimiento de los protoplastos se encuentra muy variable en cada especie, en el arándano y laurel de montaña se obtuvieron entre 10 a $20 * 10^6$ unidades, mientras que en el rododendro obtuvieron apenas 1.47 unidades en el mismo orden. Las otras especies leñosas se mantuvieron entre las 45 y $60 * 10^6$ unidades y en el caso de *Arabidopsis thaliana* el valor fue menor con un rango de 0.7 a $5 * 10^6$ unidades. Estas observaciones demuestran que los factores empleados en el aislamiento de protoplastos van a tener un efecto significativo y diferente en cada especie vegetal inclusive tratándose de especies de la misma familia, por lo cual pueden tomarse como referencia para la aplicación en experimentos de obtención de protoplastos de mortiño, y deberán compararse en un cierto rango para determinar sus valores óptimos.

Purificación de protoplastos

Esta etapa comprende una combinación de filtración, centrifugación y lavado de la solución que contiene los protoplastos aislados. Todos los estudios mencionaron que esta solución se filtra mediante un tamiz de acero inoxidable con un tamaño de poro entre 50 y $100 \mu\text{m}$ para eliminar los residuos de mayor tamaño y las células que no han sido digeridas; mientras que para separar células dañadas y las enzimas usadas para el aislamiento se hacen repetidos ciclos de centrifugación de entre 3 a 10 minutos y una velocidad de 75 a $100 \times g$ (Navrátilová, 2004).

De modo similar, en las suspensiones celulares, donde se concentran más residuos se produce un gradiente para tener a los protoplastos en flotación, en este caso los protoplastos se mezclan en una solución de sacarosa al 20% y se añade otra solución de lavado. Tras someterse la mezcla a centrifugación, se recogen los protoplastos que quedan sobre la capa de sacarosa (Schirawski, Planchais, & Haenni, 1999).

Efecto de la concentración del estabilizador de estrés osmótico en el rendimiento de los protoplastos.

Una recomendación importante para que el aislamiento de los protoplastos tenga éxito, es que se exponga al material vegetal con el que se inicia a un medio levemente hiperosmótico donde la membrana sufrirá una contracción y se separará de la pared celular (Poot & Hernández, 2013).

Al aislarse los protoplastos, la presión de la pared celular que ha sido eliminada es reemplazada por valores osmóticos apropiados de las combinaciones enzimáticas y las soluciones de lavado aplicadas. Los compuestos utilizados como reguladores osmóticos generalmente son: manitol, sorbitol, glucosa y sacarosa. Dentro de la bibliografía revisada, se describió el uso de manitol en una concentración cerca de 1M en todos los ensayos, y de sacarosa en un porcentaje de 20% en el ensayo de arándano. En una aplicación para el aislamiento de protoplastos de mortiño podría compararse el efecto del uso de estos dos reguladores osmóticos.

Los valores de un potencial osmótico óptimo para protoplastos están en un rango de 470 a 700 mOsm, se ha verificado que los protoplastos son más estables en un ambiente ligeramente hipotónico (Navrátilová, 2004).

Efectos de la velocidad y el tiempo de centrifugación en la purificación de los protoplastos.

Las diferentes velocidades y tiempos de centrifugación, tienen un efecto significativo en el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos dentro de su etapa de purificación. Ya que los protoplastos no cuentan con pared celular, estos se vuelven más sensibles a los procesos de centrifugación, aunque también va a depender de la especie vegetal de la cual se los obtenga. Es por esta razón, que suelen utilizarse períodos cortos de centrifugación y no tan altas velocidades para que en el transcurso los protoplastos no sufran daño a causa de la presión contra las paredes del recipiente en el que se encuentran (Ray, et al., 2015).

El rendimiento y la viabilidad de los protoplastos de las plantas de la familia Ericaceae revisadas, disminuían si la centrifugación superaba las 1000 rpm y duraba más de 6 minutos. Lo cual nos da una pauta para en futuros ensayos al elegir la velocidad y los tiempos de centrifugación adecuados para los protoplastos de mortiño.

Cultivo de protoplastos.

Una de las consideraciones más importantes para el cultivo de protoplastos, es que estos hayan sido purificados de manera correcta, los residuos de las paredes celulares, así como los protoplastos dañados y las enzimas de aislamiento se hayan eliminado totalmente. De la misma forma, influye el medio de cultivo; de preferencia se utiliza un medio líquido, debido a que facilita la división celular y el potencial osmótico puede regularse fácilmente; sobre todo durante las

primeras divisiones, después de haber regenerado la pared celular, se debe reducir el potencial osmótico para que la división celular no se detenga (Dědičová, 1995).

Otro factor relevante es la concentración de reguladores de crecimiento que se añade en el medio de cultivo, pues se debe tener en cuenta que los protoplastos de diferentes especies o incluso de la misma especie, pero de diferentes fuentes reaccionan de diferente forma y pueden tener requerimientos variados de nutrientes (Castro, 2017). En el cultivo de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* no hubo una diferencia significativa entre los medios de cultivo que contenían diferentes concentraciones de 2,4-D, BAP o KIN seguramente porque sus protoplastos no son sensibles a estas variaciones de forma que su exigencia nutricional no es alta (Schirawski, Planchais, & Haenni, 1999).

Los estabilizadores osmóticos también promueven la regeneración de la pared celular de los protoplastos y les permiten seguir dividiéndose y formando grupos de células, pero se desconoce la presión osmótica óptima que requieren las diferentes plantas, por lo tanto, la investigación experimental sigue siendo requerida, especialmente en el caso de mortiño, ya que se desconocen completamente estos factores.

De igual importancia es la cantidad de protoplastos que se utiliza para iniciar el cultivo, una cantidad muy baja no dará cabida a que los protoplastos activen totalmente su proceso de división. Sin embargo, la cantidad de protoplastos no determina el tiempo que tome la regeneración de la pared celular, ya que este varía según la especie tardando unas horas o algunos días y se recomienda dejar que el proceso se realice en la oscuridad por la sensibilidad a la luz que adquieren los protoplastos. El proceso de división celular, en cambio, requiere de un tiempo más prolongado generalmente 10 hasta 30 días o más (Castro, 2017).

De la existencia de cultivos de protoplastos de varias especies vegetales, se ha podido recopilar los factores relevantes mencionados anteriormente, y éstos son la pauta de la que se podría partir para estudiar experimentalmente el cultivo de protoplastos en plantas de la familia Ericaceae, especialmente del mortiño en el que no se ha realizado esta experimentación, y en especies del mismo género se encuentra en etapas iniciales por lo cual aún no se han mostrado resultados concluyentes.

Capítulo 5

Conclusiones

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una herramienta que permite la investigación para una mejora genética de la especie, lo cual no se puede lograr con métodos tradicionales de propagación.

El tratamiento general de desinfección (detergente 2%, etanol 70%, hipoclorito de sodio 2.5%), combinado con el fungicida Skul-27 a una concentración de 4 ml/L con un tiempo de inmersión de 5 minutos, permitió que la contaminación por hongo y la oxidación de los explantes de mortiño no exceda el 20%.

La utilización de material vegetal, como hojas o callos obtenidos mediante cultivo *in vitro*, evita inconvenientes de esterilización incompleta que puedan tener las hojas cultivadas en condiciones naturales y; disminuye la dificultad de captar el estado fisiológico de las hojas.

El análisis bibliográfico realizado acerca del aislamiento y purificación de protoplastos, muestra las aplicaciones *in vitro* que podrían ser útiles para la propagación del mortiño. Especialmente, la respuesta rápida y repetible de los tratamientos *in vitro* de obtención de protoplastos para una serie de estudios básicos y aplicados al mortiño.

Se evidenció que una combinación de celulasa 2%, macerozima o pectinasa 1% más manitol entre 0.25 a 1M y un proceso repetido de centrifugación de 1000 rpm entre 3 y 5 minutos, con solución de lavado de CPW son óptimas para el aislamiento y purificación de protoplastos. Además, se debe considerar que, la solución enzimática no solo rompe la pared celular, sino que,

al aumentar el tiempo de digestión, el pH o la temperatura también puede provocar daño en la membrana del protoplasto disminuyendo su viabilidad.

Capítulo 6

Recomendaciones

Se recomienda realizar un análisis para el reconocimiento de la especie del hongo que produce contaminación dentro del cultivo *in vitro* de los explantes de hoja de mortiño, ya que la detección a tiempo del tipo de hongo ayudaría a la elección del fungicida correcto y a la planificación de los procesos de desinfección.

Tomar como fuente de obtención de protoplastos directamente a las hojas de mortiño, o realizar suspensiones celulares del callo obtenido y analizar a partir de cual se alcanzan mejores resultados en cuanto a rendimiento y viabilidad de los protoplastos.

Bibliografía

- Alburquerque, D., & Gusqui, R. (2018). *Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas*. Lima, Perú: Arnaldoa.
- Arcos, A. (2010). *Obtención y aislamiento de protoplastos de trigo (*Triticum aestivum*), variedad Cojitambo, mediante el establecimiento de hojas y callos in vitro provenientes de semillas*. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército.
- Blackhall, N., M.R, D., & Power, B. (1994). Isolation, culture and regeneration of protoplasts. . *Plant Cell Culture*, 27-39.
- Borges, M. (2004). Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotecnología Vegetal. Centro de Estudios de Biotecnología y Medio Ambiente.*, 237 - 242.
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de Células y Tejidos Vegetales: Fuente de Alimentos para el Futuro. *Revista UNAM*, 3 -15.
- Castañeda, O., Gómez, F., Trejo, L., & González, M. (2014). Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *AGRO Productividad*, 16 - 21.
- Castro, C. (2017). *Obtención de protoplastos del mesófilo de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) mediante digestión enzimática*. Sangolquí, Ecuador: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Choury, Z., Meschini, R., Dell'Orso, A., Fardusi, M., Scarascia, G., & Kuzminsky, E. (2017). Optimized conditions for the isolation of mesophyll protoplasts along the growing season from *Arbutus unedo* and their use in single cell gel electrophoresis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*.

- Coba, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja*, 2 - 10.
- Codesal, V. (2016). Experimental design for the obtaining of cellular suspensions of *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. *Universidade da Coruña*, 6 - 12.
- Córdova, A., Cobos, M., Imán, S., & Castro, J. (2013). Un método eficiente para la inducción de callos *in vitro* en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "Camu Camu". *Scientia Agropecuaria*.
- CSIC. (11 de Enero de 2018). *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*. Obtenido de Seres modelícos. Entre la naturaleza y el laboratorio:
<http://seresmodelicos.csic.es/planta.html>
- Cuesta, F., Sevink, J., Llambí, L., De Bièvre, B., & Posner, J. (2014). *Avances en investigación para la conservación de los páramos andinos*. Quito: CONDESAN.
- Damm, B., & Willmitzer, L. (2008). Regeneration of fertile plants from protoplasts of different *Arabidopsis thaliana* genotypes. *Mol Gen Genet*, 15 - 20.
- Dandan, W., Wentian, G., Jiang, J., & Zhixin, L. (2011). Preparación de protoplastos de hojas de arándano. *Natural Science*, 150 - 153.
- Dědičová, B. (1995). Rastlinné protoplasty. *Biol. Listy*, 241-257.
- Ecuador Travel. (2019). Mortiño, el fruto que se toma la gastronomía nacional. *Medium*.
- Escalante, R. (2014). Embriogénesis somática y cultivo de protoplastos para la micropropagación de *Handroanthus billbergii*, *Myroxylon peruiferum* y *Centrolobium ochroxylum*, especies

nativas del bosque seco del Litoral Ecuatoriano. *Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Naturales*, 17-38.

Espinosa, C., Puente, C., & García, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Plant*, 3-10.

Gallardo de la Puente, C. (2015). Mortiño, La Perla de Los Andes . *Issuu*, 11 - 21 .

Gómez, M., & Núñez, C. (2019). Evaluación de fungicidas para el control de *Alternaria* spp. en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de laboratorio. *Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano*, 7 - 23.

González, P. (2012). *Diseño del Plan de Manejo Eco Turístico participativo para el Refugio de Vida Silvestre Paschoa, Cantón Mejía, Provincia de Pichincha*. Robamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Guerra, V. (2018). *Aislamiento de protoplastos de Solanum tuberosum (variedad Unica)*. Acobamba - Huancavelica: Universidad Nacional de Huancavelica.

Guerrero, A. (2019). *Caracterización de compuestos bioactivos, físicos y químicos del fruto del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) en la Sierra del Ecuador para uso agroindustrial*. Quito: Universidad de las Américas.

Hasegawa, S., Meguro, A., Nishimura, T., & Hitoshi, K. (2004). Drought Tolerance of Tissue-cultured Seedlings of Mountain Laurel (*Kalmia latifolia* L.) Induced by an Endophytic Actinomycete. *Institute of Biological Process Research, Akatsuka*, 43 - 47.

Hernández, Y., & González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *SciELO*, 2 - 18.

- Hine, A., & Abdelnour, A. (2013). *In vitro* establishment of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L). *Tecnología en Marcha*, 65-71.
- Jadán, M. (2000). *Obtención de protoplastos a partir de callos y suspensiones celulares de Citrus sinensis* cv. 'Acosta 6' y cv. 'Washington', y su fusión con protoplastos de hojas de patrones comerciales. Costa Rica.
- Kumari, I. (2019). A Simple Procedure for Isolation, Culture of Protoplast and Plant Regeneration. *Springer*.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Argentina: INTA.
- Loor, J., & Zambrano, A. (2016). *Estudio del Mortiño, Beneficios, y Aplicación en la Repostería*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil.
- Loor, J., & Zambrano, A. (2016). *Estudio del Mortiño, Beneficios, y Aplicación en la Repostería*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil.
- Malajovich, M. (2008). Micropropagación. Desinfección de los explantes. *Biotecnología: Enseñanza y Divulgación*, 1-7.
- Mayorga, M. F. (2012). Estudio del efecto de la deshidratación por aire sobre la capacidad antioxidante del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Universidad Tecnológica Equinoccial*, 5 - 9.
- Medina, C., Loba, M., Castaño, Á., & Cardona, L. (2015). Análisis del desarrollo de plantas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swart.) bajo dos sistemas de propagación: clonal y sexual. *Cienc Tecnol Agropecu.*, 65-77.

- Muñoz, V. (2004). *Determinación de métodos para producción de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth), con fines de propagación y producción comercial*. Quito: Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición. Agroempresas.
- Navrátilová, B. (2004). Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae – a review. *Hort. SCI. (Prague)*, 140-157.
- Norton, C., & Norton, M. (1989). Rhododendrons. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 428 - 451.
- Pérez, S., & Valdivieso, C. (2007). *Colección y caracterización morfológica in situ del mortiño (Vaccinium floribundum Kunt) en la Sierra norte del Ecuador*. Sangolquí.
- Polci, P., & Friedrich, P. (2010). Hibridación Somática. Capítulo II. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*, 197 - 210.
- Poot, W., & Hernández, T. (2013). ¿Qué son los protoplastos y para qué sirven? *ciencia*, 66 - 71.
- Rache, L., & Pacheco, J. (2010). Propagación *in vitro* de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). *Scielo*, 1086-1095.
- Ray, S., Lahiri, S., Halder, M., Mondal, M., Ray, T., & Kundu, S. (2015). Efficient Method of Isolation and Transformation of Protoplasts from Tomato Leaf Mesophyll Tissue using the Binary vector pCambia 1302. *Advanced Research Journal in Science*.
- Rodríguez, M., & Torres, M. (2018). Cultivo *in vitro*: Alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales. *Universidad Complutense de Madrid*, 6 - 17.
- Rodríguez, M., Latsague, M., Chacón, M., & Astorga, P. (2014). *In vitro* induction of callogenesis and indirect organogenesis from explants of cotyledon, hypocotyl and leaf in *Ugni molinae*. *Bosque*.

- Schirawski, J., Planchais, S., & Haenni, A.-L. (1999). An improved protocol for the preparation of protoplasts from an established *Arabidopsis thaliana* cell suspension culture and infection with RNA of turnip yellow mosaic tymovirus: a simple and reliable method. *Journal of Virological Methods*, 85 - 94.
- Segretín, M. E. (2019). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *ArgenBio*, 1 - 6.
- Smith, M., & McCown, B. (1983). A comparison of source tissue for protoplast isolation from three woody plant species. *Plant Sci Lett*, 149-156.
- Svabova, L., & Lebeda, A. (2005). *In vitro* Selection for Improved Plant Resistance to Toxin-Producing Pathogens . *Journal of Phytopathology*, 52-64.
- Torres, G. (2019). *Evaluación y optimización de variables significativas en el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de Kalanchoe spp.* Quito: Universidad de las Américas.
- Trujillo, D. (2009). Cultivo *in vitro* del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Universidad San Francisco de Quito*, 9 - 15.
- Tu Yi, S., Xiong Li, T., & Leng, B. (2009). The Studies on Technique Conditions of Protoplast Isolation and Purification of Three Species of Rhododendron. *Journal of Jiangxi Normal University*, 190 - 193.
- Xing, Z., Shen, H., & Zhao, X. (2006). Method for isolation of protoplast from young leaves of *Eleutherococcus senticosus*. *Plant Physiol Commun*, 288 - 290.

Anexos