

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

“Evaluación de dos métodos de propagación de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), para la obtención de plántulas”

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERA AGRÓNOMA

AUTORA

ENMA VERÓNICA CATOTA TIMBILA

TUTOR

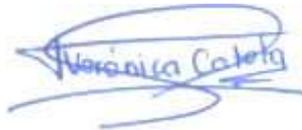
ING. JORGE DOBRONSKI ARCOS

AMBATO - ECUADOR

2021

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La suscrita, CATOTA TIMBILA ENMA VERÓNICA, portadora de la cédula de identidad número: 0503760274, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: “Evaluación de dos métodos de propagación de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), para la obtención de plántulas” es original, auténtico y personal. En la virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



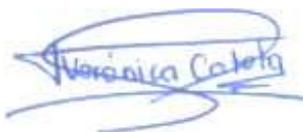
.....
Enma Verónica Catota Timbila

HOJA DE DERECHO DE AUTOR

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE PROPAGACIÓN DE MORTIÑO (*Vaccinium floribundum* Kunth), PARA LA OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniera Agrónoma, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o parte de él”.



.....

Enma Verónica Catota Timbila

**“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE PROPAGACIÓN DE MORTIÑO
(*Vaccinium floribundum* Kunth), PARA LA OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS”**

REVISADO POR:



Firmado electrónicamente por:
**JORGE ENRIQUE
DOBRONSKI ARCOS**

.....

Ing. Jorge Dobronski Arcos

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**MARCO OSWALDO
PEREZ SALINAS**

FECHA

11-02-2022

Ing. Marco Pérez Salinas PhD.

PRESIDENTE TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
**DAVID ANIBAL
GUERRERO CANDO**

10-02-2022

Ing. David Anibal Guerrero Cando Mg.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**RAFAEL ISAIAS
MERA ANDRADE**

11-02-2022

Lic. Rafael Isaías Mera Andrade

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por permitirme formar parte de una familia unida, donde existe apoyo incondicional y por ayudarme a cumplir una meta más en mi vida profesional.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, por haberme brindado la oportunidad de continuar con mis estudios universitarios en la Carrera de Ingeniería Agronómica, gracias a los conocimientos obtenidos aquí lograré incorporarme a una vida laboral en donde pueda ayudar a las personas que laboran en el campo.

Un agradecimiento especial a todos los docentes que me impartieron sus conocimientos de forma práctica y teórica para concluir con éxito mi carrera profesional.

A mis amigos quienes estuvieron apoyándome en situaciones buenas y malas y por brindarme sus experiencias relacionadas a la vida profesional, además por compartir conmigo momentos amenos durante todo este tiempo de estudio.

Enma Verónica Catota Timbila

DEDICATORIA

Primeramente, dedico mi trabajo a mis padres Enma y Vicente que fueron, son y serán el pilar fundamental en mi vida, ya que ellos han puesto todo su esfuerzo y sacrificio para apoyarme en alcanzar mis metas.

También le dedico este trabajo con mucho cariño y amor a mi hermana Mayra porque con su ejemplo de vida hizo que yo pudiera ser una persona más dedicada y responsable, depositó toda su confianza en mí y nunca dudó de mis destrezas y habilidades para concluir con esta etapa muy importante.

De igual manera, dedico este trabajo a mi hermana Paola que siempre me brinda palabras de apoyo, en mis días de depresión, ansiedad y cansancio ella siempre ha sido la persona que alegra mis días con sus locuras y ocurrencias.

A mis abuelitos, tíos y primos que siempre estuvieron al pendiente de mí, brindándome su apoyo moral e incondicional y aconsejándome para no darme por vencida y siempre estar con la cabeza en alto dando todo de mí todos los días de mi vida.

Enma Verónica Catota Timbila

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II.....	3
2 MARCO TEÓRICO	3
2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	3
2.2 MARCO CONCEPTUAL.....	4
2.2.1 Origen del Mortiño	4
2.2.2 Clasificación botánica.....	5
2.2.3 Morfología del mortiño.....	5
2.2.4 Requerimientos edafoclimáticos	6
2.2.5 Beneficios del mortiño en la salud	6
2.2.6 Valor nutricional del mortiño.....	7
2.2.7 Propagación vegetativa.....	7
2.2.8 Medios de cultivo	9
CAPÍTULO III	12
3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	12
3.1 Hipótesis.....	12
3.2 Objetivos	¡Error! Marcador no definido.
3.2.1 Objetivo General.....	12
3.2.2 Objetivos específicos	12
CAPÍTULO IV	13
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1 UBICACIÓN DEL ENSAYO.....	13
4.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR	13
4.3 EQUIPOS Y MATERIALES	13
4.3.1 Materiales propagación por estacas.....	13
4.3.2 Propagación <i>in vitro</i>	14
4.3.3 Equipos de oficina	16
4.4 FACTORES EN ESTUDIO.....	16
4.4.1 Factores en estudio propagación por estacas	16
4.4.2 Factores en estudio para la propagación <i>in vitro</i>	16
4.5 TRATAMIENTOS	17

4.5.1	Tratamientos propagación por estacas	17
4.5.2	Tratamientos establecimiento <i>in vitro</i>	17
4.6	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	18
4.7	MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	18
4.7.1	Recolección de muestras	18
4.7.2	Procedimiento propagación por estacas.....	18
4.7.3	Procedimiento propagación <i>in vitro</i>	22
4.8	VARIABLES RESPUESTA.....	26
4.8.1	Propagación por estacas	26
4.8.2	Propagación <i>in vitro</i> por esquejes.....	28
4.9	PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.....	29
CAPÍTULO V		30
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
5.1	Obtención plantas de <i>V. floribundum</i> en condiciones semicontroladas mediante estacas.....	30
5.2	Establecimiento <i>in vitro</i> de explantes tomados a partir de plantas silvestres. 35	
CAPÍTULO VI		39
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
6.1	CONCLUSIONES.....	39
6.2	RECOMENDACIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA		41
ANEXOS.....		45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Recolección de muestras de tallos de mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth)	19
Figura 2: Sustratos en fundas plásticas.....	19
Figura 3.- Medición y corte de 40 estacas.....	20
Figura 4.- Estacas sumergidas en enraizador Raizal 400.....	21
Figura 5.- Estaca sumergida en enraizados Induktor.....	21
Figura 6.- Estacas colocadas en sus respectivos sustratos.	22
Figura 7.- Matraces con los medios de cultivo.....	23
Figura 8.- Esterilización en autoclave.....	23
Figura 9.- Frascos esterilizados dentro de la cámara de flujo laminar	24
Figura 10.- Frascos con medio de cultivo y etiquetados.....	24
Figura 11.- Esquejes sumergidos en hipoclorito.	25
Figura 12.- Esquejes sembrados	26
Figura 13.- Frascos colocados en repisas con luz artificial 12h/luz/día.	26

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía del Mortiño	5
Cuadro 2: Requerimientos Agroecológicos y Edáficos del Mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunt)	6
Cuadro 3: Contenido nutricional del Mortiño.....	7
Cuadro 4: Tratamientos ensayo por estacas.....	17
Cuadro 5: Tratamientos ensayo <i>in vitro</i>	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Influencia del tipo de sustrato sobre el vigor de la estaca evaluado al inicio del ensayo	30
Tabla 2. Influencia del tipo de sustrato sobre el número de brotes a los 15 días de montado el ensayo	31
Tabla 3. Influencia del tipo de sustrato sobre el número de brotes a los 30 días de montado el ensayo	31
Tabla 4. Influencia del tipo de sustrato sobre el número de brotes a los 45 días de montado el ensayo	32
Tabla 5. Influencia del tipo de sustrato sobre el número de brotes a los 60 días de montado el ensayo	32
Tabla 6. Influencia del tipo de sustrato sobre la longitud del brote a los 15 días de montado el ensayo	33
Tabla 7. Influencia del tipo de sustrato sobre la longitud del brote a los 30 días de montado el ensayo	33
Tabla 8. Influencia del tipo de sustrato sobre la longitud del brote a los 45 días de montado el ensayo	34
Tabla 9. Influencia del tipo de sustrato sobre el vigor en la base de la estaca ...	34
Tabla 10. Influencia del tipo de medio de cultivos sobre el porcentaje de contaminación y de explantes vigorosos en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> del primer ensayo.	35
Tabla 11. Influencia del tipo de medio de cultivos sobre el porcentaje de contaminación y de explantes vigorosos en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> del segundo ensayo	36
Tabla 12. Influencia del tipo de medio de cultivos sobre el porcentaje de contaminación y de explantes vigorosos en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> del tercer ensayo	36
Tabla 13. Influencia del tipo de medio de cultivos sobre el porcentaje de contaminación y de explantes vigorosos en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> del cuarto ensayo	37
Tabla 14. Influencia del tipo de medio de cultivos sobre el porcentaje de contaminación y de explantes vigorosos en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> del quinto ensayo	38

RESUMEN

Los sustratos compuestos suelo de páramo con Raizal 400 fue donde se observó el mayor vigor de las estacas (al inicio el ensayo), número de brotes (a los 30, 45 y 60 días), longitud del brote (a los 15, 30 y 45 días). El mayor vigor en la base de la estaca se observó en el tratamiento compuesto a base de suelo de páramo más Induktor sin presencia de necrosis en las estacas. En relación con el porcentaje de contaminación del primer ensayo fue similar para ambos medios de cultivo tanto en la primera como en la segunda evaluación. Asimismo, en la tercera evaluación no se observaron diferencias en el porcentaje de explantes vigorosos. El porcentaje de contaminación del segundo ensayo mostró que el mayor porcentaje de contaminación en la primera y tercera evaluación se alcanzó en los frascos de cultivos que contenían el medio de cultivo MS (Murashige y skoog) utilizando 7,5 g de sacarosa, 0,5 g de phytigel y 1,11 g de MS para 250ml. Sin embargo, en la segunda evaluación el mayor porcentaje de contaminación se detectó en el medio AM compuesto por la mitad del medio MS, excepto el phytigel: 3,75 g de sacarosa, 0,5 g de phytigel y 0,555 g de medio MS para 250ml. En la tercera evaluación no existieron diferencias en el porcentaje de contaminación entre los medios de cultivo MS y AM. Con el presente trabajo se logró establecer plantas en condiciones semicontroladas de *V. floribundum* mediante estaquillado lo cual ayudará a conformar bancos de plantas donantes para en un futuro proseguir con la fase de establecimiento *in vitro* de explantes.

Palabras clave: establecimiento, estaquillado, *in vitro*, plantas silvestres, propagación.

ABSTRACT

The paramo soil composite substrates with Raizal 400 showed the highest vigor of the cuttings (at the beginning of the trial), number of shoots (at 30, 45 and 60 days), shoot length (at 15, 30 and 45 days). The highest vigor at the base of the stake was observed in the composite treatment based on paramo soil plus Induktor without the presence of necrosis in the cuttings. In relation to the percentage of contamination of the first test, it was similar for both culture media in both the first and the second evaluation. Likewise, in the third evaluation, no differences were observed in the percentage of vigorous explants. The percentage of contamination of the second trial showed that the highest percentage of contamination in the first and third evaluation was reached in the culture flasks containing the MS (Murashige y skoog) 7.5 g sucrose, 0.5 g phytagel and 1.11 g MS for 250ml, culture medium. However, in the second evaluation, the highest percentage of contamination was detected in the AM the elements are half of the MS medium, except the phytagel: 3.75 g of sucrose, 0.5 g of phytagel and 0.555 g of MS medium for 250 ml. In the third evaluation, there were no differences in the percentage of contamination between the MS and AM culture media. With the present work, it was possible to establish plants under *V. floribundum* conditions by cutting which will help to form donor plant banks to continue with the future *in vitro* establishment phase of explants.

Key words: establishment, staked, *in vitro*, wild plants, propagation

CAPÍTULO I

1 INTRODUCCIÓN

El mortiño es nativa de los páramos Andinos, se hallan a una altitud de los 2500 y 4300 m.s.n.m, en los páramos ecuatorianos se localizan tres especies como son *Vaccinium floribundum*, *Vaccinium crenatum* y *Vaccinium distichum*, la especie que tiene mayor distribución es (*Vaccinium floribundum*), se puede hallar desde los 1000 m.s.n.m a 4500 m.s.n.m, principalmente se encuentra en las provincias de Zamora, Tungurahua, Imbabura, Sucumbíos, Pichincha, Napo, Morona Santiago, Loja, Cotopaxi, Chimborazo, Carchi, Cañar, Bolívar y Azuay (**Gallardo 2015**).

El mortiño es una baya que ha sido consumida desde tiempos remotos, especialmente se ha utilizado para la elaboración de la colada morada en el tradicional día de los difuntos. Actualmente el mortiño es consumido en jugos, mermeladas o dulces elaborados artesanalmente, este fruto tiene grandes aportes nutricionales para el cuerpo humano, contiene antioxidantes, vitamina C, vitaminas del complejo B y algunos minerales como fósforo, potasio y calcio, además en la salud evita el cáncer al estómago y asimismo a nivelar el azúcar en la sangre en individuos con diabetes (**Coba et al. 2012**).

En la actualidad muchos de los páramos en donde crece el mortiño de manera silvestre se ven afectados por la explotación agrícola y ganadera que traspasa sus fronteras, esto hace que cada año el mortiño este en riesgo de desaparecer, ya que nadie ha podido cultivarla. Según **USFQ (2016)**, cuidar los páramos se ha vuelto una prioridad en el presente, para poder preservar muchas de las especies que se encuentran ahí de manera silvestre, por esta razón se debe trabajar mediante estrategias agrícolas, y como alternativa para cuidar el mortiño es el cultivo en laboratorio. Esta especie (*Vaccinium floribundum*) posee gran importancia para la flora y fauna de los páramos y sus comunidades andinas, al proteger y cultivar estas especies en los páramos en donde ha sufrido deforestación, refuerza la recuperación del suelo con la ayuda de las raíces en

lugares que fueron quemados, tiene una notable influencia en la reforestación (**Argudo 2017**).

La producción de plantas de mortiño se puede realizar de forma sexual, es decir, mediante semillas, este es un proceso de duración larga debido a la lenta germinación, la segunda forma es por reproducción asexual la cual puede ser por estacas, en esta ha existido estudios donde afirman que existe inconvenientes porque la estaca no presenta enraizamiento, también de forma asexual se presenta el cultivo *in vitro* mediante esquejes, brotes, células, esta presenta mayor velocidad de multiplicación así como también uniformidad en todo el material vegetal, este cultivo es desarrollado en el laboratorio (**Recto 2018**).

Diferentes autores han realizado ya varias investigaciones de la producción de mortiño, en el caso de **Muñoz (2004)** quien realizó un estudio de determinación de varios métodos para la producción de mortiño con aspectos de producción comercial, además menciona que si se encontrara un método adecuado para la propagación se podría expandir el consumo de mortiño a una mayor parte de la población, además se lograría realizar exportaciones, una ventaja que presenta esta planta es que no presenta mayores pérdidas por plagas y enfermedades.

Con todo lo expuesto anteriormente surgió la necesidad de plantear una investigación en la que se pueda desarrollar una adecuada propagación del mortiño, con esto evaluar el mejor método que brinde características de calidad y sanidad vegetal, para posteriormente empezar las labores de producción masiva de plántulas, aclimatación y cultivos en campo. Todo esto llevará un gran proceso para finalmente poder cultivar mortiño en zonas con diferente aspectos climáticos y edáficos que al de su origen.

CAPÍTULO II

2 MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Trujillo (2008), en su tesis “Cultivo *in vitro* del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)”, menciona que realizó ensayos con yemas axilares de mortiño, para esto ocupó TZR 7 mg/l adicionándole 0,1 mg/l de NAA, además utilizó de 3 a 5 mg/l de 2iP esto ayudó a la propagación y elongación. Como resultado no se dio regeneración de los retoños esperados, pero se encontró con varias composiciones de hormonas que son posibles estimulantes de desarrollo de callos.

Muñoz (2004), en su trabajo de tesis “Determinación de métodos para la producción de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), con fines de propagación y producción comercial” señala que el mortiño debería considerarse como un cultivo importante en el Ecuador, ya que esta especie se ve afectada por su aprovechamiento cada año, pero no existe repoblación de la especie y va desapareciendo, visto esta necesidad la autora en su proyecto trabajó en tres métodos de reproducción; así utilizó la propagación por estacas que consistió en tomar ramas de la planta madre ponerlas en cuatro diferentes sustratos adicionando un enraizador, el siguiente ensayo estableció un cultivo de micro estaquillas sembradas en sustrato y por último el establecimiento *in vitro* por semillas utilizando medios MS y AM. Como resultado de estos ensayos menciona que de la propagación por estacas solo una de ellas sobrevivió la que se encontraba en tierra de páramo, del ensayo por estaquillas todas se secaron en pocos días y del cultivo *in vitro* emergió un 95% de las semillas, pero requirió investigar más sobre la temperatura a la que debe estar expuesta, a la humedad y al número de horas frío ya que por no tener claro estos requerimientos hubo problemas en su desarrollo y alcanzaron una longitud de entre 0.5 a 3 cm.

Chamorro (2019), menciona que el mortiño es una especie silvestre que crece en los páramos ecuatorianos y para ayudar a su conservación plantea investigar estrategias

para domesticar esta especie y que ha futuro se logre establecer una plantación comercial, para ello realizó una investigación con el tema “Determinación de métodos de propagación sexual y asexual del mortiño (*Vaccinium floribundum*) con fines de conservación de la especie” la que trató en utilizar dos ensayos, la primera por el método sexual y la segunda por el método asexual manejando yemas, utilizó el medio de cultivo WPM y MS al 50%, además utilizó reguladores de crecimiento como el Ácido naftalénico acético y Benzil amino purina; se requirieron noventa días para evaluar los resultados, logró buenos resultados en el tratamiento uno que fue el ensayo sexual por semillas que obtuvo un 56,66% de germinación esto en medio de cultivo MS, mientras que el medio WPM obtuvo un porcentaje de germinación del 46,36%.

2.2 MARCO CONCEPTUAL

2.2.1 Origen del Mortiño

En la región Andina se desarrollan grandes extensiones de agricultura tradicional y propia del lugar, es un gran escenario para quienes no desean perder cultivos autóctonos, en los Andes podemos encontrar gran variedad de especies vegetales nativas dentro de los 2500 m.s.n.m hasta los 4300 m.s.n.m. (**Coba et al. 2012**).

Según **Coba et al. (2012)**, indica que también se denominaba Perla Negra al fruto del mortiño, el mortiño desde tiempos remotos ha sido una de las bases fundamentales de alimentaciones de quienes habitan los Andes, muy conocida y usada hasta antes de la llegada de los españoles. Actualmente y pese a que muchos extranjeros han querido invadir los páramos Andinos con especies traídas de otros países, no lo han logrado, muchas especies como el mortiño logran adaptarse bien a la invasión y afortunadamente siguen en su hábitat natural.

Muchos ingeniosos chefs han visto a este cultivo como un tesoro ya que es una de las especies endémicas del Ecuador, estos expertos en la cocina hacen que el mortiño sea

transformado en deliciosos postres, además que desde hace tiempo se ha tomado al mortiño como elemento principal para la elaboración de la tradicional colada morada, de igual forma el consumo de esta baya le trae grandes beneficios a la salud (**Gallardo 2015**).

2.2.2 Clasificación botánica

En el Ecuador se encuentran tres especies de mortiño más reconocidos, de los cuales dos son nativas y una de ellas es endémica, estas son: (*Vaccinium floribundum*), (*Vaccinium crenatum*) y (*Vaccinium distichum* Luteyn). (*Vaccinium floribundum*) es una especie de los Andes que se distribuye por las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Cotopaxi, Chimborazo, Carchi, Loja, Morona Santiago, Napo, Pichincha, Sucumbíos, Imbabura, Tungurahua y Zamora (**Gallardo 2015**).

Cuadro 1. Taxonomía del Mortiño

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Género	Vaccinium
Especie	<i>V. floribundum</i>

Fuentes: (Universidad Nacional de Colombia 2019)

2.2.3 Morfología del mortiño

Es un arbusto que puede llegar a medir hasta 2,5 m de altura, de hojas simples y pequeñas su margen es aserrado y su nervadura es pinnada, presenta inflorescencia en racimos de hasta 1,5 cm de longitud, cáliz articulado de 3 a 4 mm de largo, corola en

forma cilíndrica de 6 a 8 mm de largo se presenta en color blanquizo o rosada, el fruto es una baya en tonos azuladas a negras, son redondos y pueden mediar de 5 a 8 mm de diámetro (**Loor 2016**).

2.2.4 Requerimientos edafoclimáticos

Cuadro 2: Requerimientos Agroecológicos y Edáficos del Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt)

Temperatura	Desde los 8°C hasta los 16°C
Clima	Frío – templado
Humedad	Desde el 60% hasta 80%
Precipitación	800 mm/año hasta los 2000 mm/año
Altitud	1000 m.s.n.m - 4500 m.s.n.m.
Textura	Suelos arenosos, húmíferos, sueltos y deben contener materia orgánica
Acidez	pH comprendido entre 4 y 6
Relación C/N	13:14

Fuente: (Mayorga 2012)

2.2.5 Beneficios del mortiño en la salud

El fruto del mortiño tiene gran contenido de azúcar, así como también minerales, antioxidantes, vitaminas del complejo B y C, minerales como potasio, calcio y fósforo (**Coba et al. 2015**).

El consumir el mortiño ayuda a restablecer los niveles de azúcar en la sangre cuando las personas tienen problemas de diabetes o hipoglicemia, ayuda a los problemas digestivos, previene el cáncer (**El Mundo 2007**). Además, consumir las flores ayuda a tratar afecciones nerviosas, ayuda a evitar problemas de inflamación en las vías

urinarias, reduce el riesgo de contraer enfermedades cardíacas y ayuda a limpiar la grasa que se acumula en las arterias (**Gallardo 2015**).

2.2.6 Valor nutricional del mortiño

Cuadro 3: Contenido nutricional del Mortiño

Componentes	Cantidad (g/100g)
Agua	83,2
Carbohidratos	15,3
Fibras	1,5
Proteínas	0,7
Grasas	0,5
Pectinas	0,5
Azucares totales	10 – 14
Sacarosa	0,24
Fructosa	4,04
Glucosa	3,92
Contenido solidos sólidos solubles	10,1 - 14,2
Vitaminas	100
Ácido ascórbico	14

Fuente: (Mayorga 2012)

2.2.7 Propagación vegetativa

2.2.7.1 *Propagación sexual*

Este tipo de propagación se la realiza mediante el uso de semillas, es un tipo de reproducción más utilizado en todo el mundo, tienen una alta versatilidad genética es decir tienen características muy resistentes que la propia naturaleza les brinda con el

fin de adaptarse al medio en el que se encuentren, existe una gran variabilidad en relación a su descendencia ya que los individuos que nacen por semillas son muy diferentes a la planta madre. La semilla de (*Vaccinium floribundum*) no es apta para secado, si se realiza ese procedimiento antes de la siembra estas semillas nunca germinarán, es decir son semillas recalcitrantes (**Chamorro 2019**).

2.2.7.2 *Propagación asexual*

Este tipo de propagación también llamado propagación vegetativa o clonación, consiste en que, a partir de la obtención de un tejido, célula u órgano como tallo, hojas, raíces o ramas, se dará origen a otra planta con características iguales a la planta madre, teniendo en cuenta que las condiciones ambientales como temperatura, sanidad, luz y nutrientes sean aptas para su desarrollo y crecimiento. Esta reproducción se enfoca en la obtención de plantas de alta calidad y tolerantes a diferentes tipos de estrés, así como resistentes a plagas y enfermedades, además busca que estas características ideales se transfieran de generación en generación (**Rojas et al. 2004**).

Para la propagación vegetativa asexual del mortiño se proponen dos métodos que son la propagación por estacas y estaquillados, ambos métodos no son costosos son fáciles y rápidos de instalar, se debe tener muy en cuenta la calidad del sustrato en el que va a plantar, observar que tenga las características necesarias para que las estacas y estaquillas puedan generar raíces sanas y fuertes que le ayuden a alimentarse de nutrientes posteriormente y obtener una evolución más rápida y uniforme (**Chamorro 2019**).

Aquí también se incluye la propagación por yemas axilares o esquejes sembrado bajo un medio de cultivo y hormonas que ayuden al crecimiento para lograr buenos resultados, este proceso debe ser cuidadoso, se requiere de un espacio aséptico, una buena desinfección de los explantes y esterilización de materiales (**Chamorro 2019**).

2.2.7.3 *Cultivo in vitro*

La técnica de cultivo *in vitro* consiste en seleccionar una parte vegetal como puede ser semilla, tallo, nudo, meristemo, hoja, antera, ápice, entre otros segmentos y colocarlos en un medio estéril nutritivo gelificado usualmente semisólido, a partir de estas se generará una o varias plantas nuevas. Actualmente la técnica de cultivo *in vitro* es una de las más utilizadas para el establecimiento de plantas con el objetivo de cultivar especies vegetales sanas y con características genotípicas definidas (**Intagri 2021**).

Esta técnica es utilizada para la propagación de mortño *in vitro* mediante esquejes, seleccionando la planta madre con características sanas libre de plagas y enfermedades.

2.2.8 Medios de cultivo

El medio de cultivo es un conjunto de nutrimentos y componentes que poseen factores de desarrollo y crecimiento, cada especie tiene una formulación diferente ya que no todas necesitan los mismos nutrientes para poder desarrollarse en un medio artificial. El medio de cultivo debe estar bajo condiciones controladas de humedad, temperatura y luz, que conjuntamente con los nutrientes incluidos en su fórmula ayudarán al progreso y evolución de los explantes que posteriormente generarán órganos que le ayuden a crecer y echar raíces. Para poder lograr una respuesta positiva a este tipo de cultivo se tiene que seleccionar el material vegetal de una planta madre con características adecuadas y que tengan una buena edad ontogenética (**Intagri 2021**).

2.2.8.1 *Composición del medio de cultivo*

El medio de cultivo debe contener elementos necesarios y fundamentales que le ayude al desarrollo de la planta. Generalmente están compuesto de:

- Sales inorgánicas

Aquí intervienen los macronutrientes como son: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), de estos elementos se requiere en mayor cantidad y en bajas dosis, pero que de igual forma son necesarios podemos encontrar elementos denominados micronutrientes como: hierro (Fe), cobalto (Co), zinc (Zn), molibdeno (Mo) y boro (B), se recomienda no utilizar en altas dosis ya que puede ocasionar toxicidad a los explantes (**Chamorro 2019**).

- Fuentes de carbono

Está dentro de los compuestos orgánicos, son los encargados de generar fuentes de energía a la planta dentro de estos podemos encontrar a la glucosa y sacarosa, estos proveen de elementos tales como el carbón, hidrógeno y oxígeno. Cuando la planta crece en campo abierto son suministradas de forma natural con estos elementos cuando realizan el proceso de fotosíntesis (**Chamorro 2019**).

- Vitaminas

Son fuente importante para la división celular y desarrollo de la planta, generalmente se presentan las tiaminas, el ácido nicotínico, el inositol y las piridoxinas, además se pueden agregar la biotina y el ácido pantoténico. Las vitaminas se hacen en soluciones concentradas y además son solubles en agua (**Muñoz 2004**).

- Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento intervienen en el desarrollo de la planta estos pueden ser compuestos químicos o fitohormonas es decir que son generados por la propia planta. Las hormonas más importantes son:

Auxinas: las variedades encontradas son AIA, AIB, 2,4-D, Ácido o-naftalenacético (NAA) (sintético). A nivel vegetal ayuda a la formación y crecimiento longitudinal del tallo, promueve la producción de raíces y aumenta la dominancia apical. A nivel celular ayuda a la división, elongación, diferenciación celular, ayuda a la permeabilidad celular, producción de proteína y disminución de presión en la pared celular, su precursor orgánico es L-Triptófano (**Alcantara et al. 2019**).

Giberelinas: principales variedades encontradas en su forma activa GA1, GA2, GA3, ayuda a promover el crecimiento de frutos, en el desarrollo de la flor y en la división

celular, además induce al crecimiento radicular, permite la inhibición de pigmentos en frutas, así como también refuerza la germinación de las semillas (**Fichet 2017**).

- Citoquininas

Antama (2017) menciona que, las citoquininas son fitohormonas que ayudan a la diferenciación y división celular, además de intervenir en el desarrollo y crecimiento de la planta. Las variedades de citoquinina encontradas son la Kinetina, Zeatina, Benciladenina y 4-hidroxifeniletíl alcohol. Intervienen en toda la planta desde la inducción de raíces, deterioro estructural de las hojas y estimula la generación de brotes (**Alcantara et al. 2019**).

CAPÍTULO III

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

La propagación por cultivo *in vitro* y por estacas para la producción de plántulas de mortiño, muestran diferencias significativas en tiempo y porcentaje de prendimiento.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo General

Evaluar dos métodos de propagación para la producción de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).

3.2.2 Objetivos específicos

- Obtener plantas de (*Vaccinium floribundum* Kunth) en condiciones semicontroladas mediante estacas.
- Establecer *in vitro* explantes tomados a partir de plantas silvestres.

CAPÍTULO IV

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 UBICACIÓN DEL ENSAYO

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, ubicada en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua, localizado a una altura de 2850 m.s.n.m. las coordenadas geográficas son: 78°35'00" longitud Oeste y 01°24'27" latitud Sur.

4.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

Los ensayos para la propagación por estacas y establecimiento *in vitro* de *Vaccinium floribundum* se realizaron en el laboratorio de Biotecnología Vegetal bajo condiciones de ambiente controlado, el mismo que está instalado en los Laboratorios de Investigación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

4.3 EQUIPOS Y MATERIALES

4.3.1 Materiales propagación por estacas

Este método de propagación es muy utilizado en la agricultura para generar nuevas plantas de una manera más sencilla y a corto plazo, depende además del sustrato, hormonas o compuesto químico que se adicione al suelo para que la estaca enraíce más rápido y así poder obtener plántulas homogéneas y de buena calidad (**Hagiwara y Sisaro 2016**).

4.3.1.1 Materiales

- Planta madre del mortiño

- Estacas procedentes de la planta madre
- Tierra negra de páramo
- Humos
- Fundas plásticas negras pequeñas
- Guantes
- Agua de lluvia
- Vasos de plásticos pequeños
- Vasos de precipitación
- Matraces
- Varilla de agitación
- Peras de succión
- Pipetas
- Papel aluminio
- Cucharas dosificadoras
- Enraizador Raizal 400
- Enraizador Induktor
- Papel desechable
- Tijeras podadoras
- Tanque 200 litros

4.3.1.2 Equipos

- Balanza electrónica
- Refrigeradora

4.3.2 Propagación *in vitro*

El cultivo *in vitro* en los últimos años ha formado parte de un gran avance en la biotecnología y consiste en aislar muestras de tejidos, órganos o células vegetales de la planta y colocarlas en un medio nutritivo bajo condiciones climáticas artificiales. A

partir de estos explantes se obtendrán plantas sanas con rasgos genéticos específicos (Intagri 2021).

4.3.2.1 *Materiales*

- Planta madre del mortiño
- Esquejes obtenidos de la planta madre del mortiño
- Medio MS
- Medio AM
- Tween 20
- Azúcar
- Phytigel
- Agua destilada
- Alcohol al 70%
- Alcohol industrial
- Cloro al 5%
- Recipientes de vidrio
- Cajas Petri
- Matraces
- Vasos de precipitación
- Mechero
- Papel aluminio
- Probeta
- Pinzas
- Bisturí
- Lamina
- Fósforo
- Cucharas de laboratorio
- Guantes
- Papel desechable

4.3.2.2 *Equipos*

- Cámara de flujo laminar
- Balanza eléctrica
- Autoclave
- Microondas
- Refrigerador

4.3.3 Equipos de oficina

- Laptop
- Esferos
- Cuaderno de apuntes
- Marcadores permanentes
- Stikers fosforescentes
- Calculadora
- Cámara fotográfica
- Regla

4.4 FACTORES EN ESTUDIO

4.4.1 Factores en estudio propagación por estacas

- Suelo de páramo
- Humus
- Aplicación del enraizador Raizal 400 a los 15, 30, 45 días, en dosis de 5 g en 500 ml de agua de lluvia
- Aplicación del enraizador Induktor a los 15, 30, 45 días, en dosis de 2,5 ml en 500 ml de agua de lluvia

4.4.2 Factores en estudio para la propagación *in vitro*

- Medio de cultivo MS

- Medio de cultivo AM

4.5 TRATAMIENTOS

4.5.1 Tratamientos propagación por estacas

Se utilizaron cuatro tratamientos con diez repeticiones cada una, con dos sustratos diferentes que fueron suelo de páramo y humus, además se utilizaron dos enraizadores diferentes, Raizal 400 e Induktor como se detalla a continuación en el cuadro 4.

Cuadro 4: Tratamientos ensayo por estacas

NÚMERO	SIMBOLOGÍA	DESCRIPCIÓN
1	T1	Suelo de páramo + Raizal 400
2	T2	Humus + Raizal 400
3	T3	Suelo de páramo + Induktor
4	T4	Humus + Induktor

4.5.2 Tratamientos establecimiento *in vitro*

Se utilizaron dos tratamientos con diez repeticiones cada una, con diferente medio de cultivo como se detalla en el cuadro 5.

Cuadro 5: Tratamientos ensayo *in vitro*

NÚMERO	SIMBOLOGÍA	DESCRIPCIÓN
1	T1	Medio de cultivo MS
2	T2	Medio de cultivo AM

4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los ensayos se realizaron con un diseño experimental completamente aleatorizado.

4.7 MANEJO DEL EXPERIMENTO

4.7.1 Recolección de muestras

El ensayo comenzó con la selección de las plantas madres de mortiño, al observar detenidamente el medio se seleccionaron dos plantas madres que presentaban características favorables, estaban libre de plagas y enfermedades, eran las plantas más grandes y frondosas de color verdoso atrayente. Con la ayuda de una tijera de podar bien desinfectada se procedió a cortar tallos jóvenes y adultos, luego se colocó en papel periódico húmedo se envolvió y se colocó dentro de una funda plástica, esto con el objetivo de que permanezcan frescas hasta llegar al laboratorio y colocarlas en el refrigerador. Las muestras recolectadas se utilizaron tanto en el ensayo por estacas como *in vitro*.

4.7.2 Procedimiento propagación por estacas

Para el ensayo por estacas de mortiño se procedió a dividir muestras de estacas en cuatro grupos de diez, que posteriormente fueron expuestos a diferentes tratamientos para poder comprobar cuál de ellos resulta más eficiente para lograr el desarrollo de brotes que posteriormente generará una nueva planta.

Se tomaron cuarenta fundas plásticas perforadas, en las veinte primeras fundas se colocó suelo negro de páramo, esta tierra se recolectó directamente del lugar en donde crece el mortiño. En las siguientes veinte fundas se procedió a colocar humus.



Figura 1: Recolección de muestras de tallos de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).



Figura 2: Sustratos en fundas plásticas.

Se tomaron las muestras del mortiño, se procedió a medir y cortar las estacas a una longitud de 25 cm cada una, en total se tomaron 40 muestras de estacas entre tallos jóvenes y maduros. Además, se retiraron las hojas dejando en la estaca unos 10 cm con hojas para permitir que de ahí nazcan los nuevos brotes.



Figura 3.- Medición y corte de 40 estacas.

Una vez recortadas las estacas, se procedieron a preparar las soluciones del enraizador. En primera instancia se tomó el enraizador Raizal 400, el mismo que fue disuelto 5 g en 500 ml de agua de lluvia, esta solución preparada se colocó en un vaso de precipitación de 75 ml, se tomaron las primeras 20 estacas y se sumergieron en la solución aproximadamente 10 cm de su base, dejándolas por un periodo de 10 minutos.

Se procedió a preparar la solución con el enraizador Induktor, se utilizaron 2,5 ml en 500 ml de agua de lluvia. Se tomaron 20 estacas y se sumergieron en la solución unos 10 cm de su base, se dejaron sumergidos durante 10 minutos.

Pasados los 10 minutos se retiraron las estacas de las soluciones, las primeras 20 estacas sumergidas en la solución Raizal 400 se colocaron en las primeras 10 en fundas que contenían suelo de páramo y las siguientes 10 en fundas que contenían humus. Las 20 estacas que estaban sumergidas en solución Induktor se colocaron a su vez en 10 fundas con suelo de páramo y las últimas 10 en fundas con humus.

Con los 425 ml restantes de cada solución, se procedió a hacer un riego edáfico en cada tratamiento. Por último, se procedió a su identificación con rótulos.



Figura 4.- Estacas sumergidas en enraizador Raizal 400.



Figura 5.- Estaca sumergida en enraizados Induktor.



Figura 6.- Estacas colocadas en sus respectivos sustratos.

4.7.3 Procedimiento propagación *in vitro*

Para realizar este ensayo se utilizaron dos medios de cultivo el MS (Murashige y Skoog) y AM que consiste en mezclar la mitad de la composición que se encuentra en el medio MS. Es necesario recalcar que para realizar todo el trabajo en laboratorio se utilizó mandil, mascarillas y guantes para evitar cualquier contaminación.

4.7.3.1.1 Preparación de medios MS y AM

Para la elaboración de 250 ml de medio MS:

- Con la ayuda de una balanza electrónica se procedió a pesar: 7,5 g de sacarosa, 0,5 g de phytigel y 1,11 g de MS.
- Los elementos pesados se colocaron en un matraz que contenía 250 ml de agua destilada, se colocó papel aluminio para tapar y se ajustó con ligas elásticas, se procedió a batir hasta tener una mezcla homogénea sin grumos.



Figura 7.- Matracas con los medios de cultivo.

- Se etiquetó y se llevó a la autoclave para esterilizar alrededor de 45 minutos a 121 °C.



Figura 8.- Esterilización en autoclave.

- Terminado el tiempo se retiró de la autoclave y se dejó enfriar.
- Antes de usar la cámara de flujo laminar se limpió con alcohol al 70% y cloro al 5%, posteriormente se dejó actuar la luz ultravioleta alrededor de 5 minutos, pasado este tiempo de apagó la luz ultravioleta se prendió la luz normal.
- En la cámara de flujo laminar se colocaron los frascos de vidrio previamente esterilizados.
- En los frascos de vidrio se colocó el medio MS en una cantidad de 25 ml en cada frasco, se cerró bien los frascos, se etiquetó y se dejó pasar un día para que el medio este apto para la siembra.
- Los frascos se dejaron dentro de la cámara de flujo laminar hasta el día de la siembra.



Figura 9.- Frascos esterilizados dentro de la cámara de flujo laminar.



Figura 10.- Frascos con medio de cultivo y etiquetados.

Para la elaboración de 250 ml de medio AM

- Para el medio AM se pesaron las siguientes cantidades, tomando en cuenta que los elementos son la mitad del medio MS, excepto el phytigel: 3,75 g de sacarosa, 0,5 g de phytigel y 0,555 g de medio MS.
- Una vez obtenida la mezcla uniforme se realizó el mismo procedimiento que con el medio MS.

4.7.3.1.2 Preparación de hipoclorito de sodio al 3% para esterilización de esquejes

Se tomó cloro al 5%, para obtener un hipoclorito al 3% se realizó una regla de tres, en donde 3% se multiplicó para 100 ml de solución y se dividió para el 5%, dando como resultado 60 ml de NaClO y para obtener 100 ml de solución se colocó 40 ml de agua destilada.

$$\frac{0,3\% \times 100\text{ml}}{5\%}$$

= 60 ml NaClO + 40 ml H₂O

4.7.3.1.3 Siembra *in vitro* de esquejes

- Se procedió a limpiar con alcohol y cloro la cámara de flujo laminar, una vez limpia se colocaron todos los materiales estériles a utilizarse en el trabajo.
- Se tomaron las muestras de tallo, se colocaron en un vaso de precipitación y se procedió a lavar en agua cada uno de los tallos, posteriormente se colocó dentro de la cámara de flujo laminar.
- Con la ayuda de una placa, pinzas y bisturí se procedió a cortar los esquejes aproximadamente de 2,5 cm, se recortaron 20 esquejes, cabe recalcar que estos cortes se realizaron en tallo jóvenes y adultos.
- Se tomaron los cortes y se colocaron en un vaso de precipitación que contenía alcohol al 70%, se dejó sumergido por 5 minutos.
- Se retiraron las muestras del alcohol y se lavaron con agua destilada para que no quede restos de alcohol.
- Una vez lavado, se tomaron los esquejes y se colocaron en el hipoclorito de sodio al 3%, a esta solución se le agregaron 5 gotas de Tween 20, aquí se mantuvieron sumergidas por 15 minutos.
- Pasado este tiempo se procedió a retirar los esquejes del hipoclorito y se realizaron tres lavados en agua destilada para eliminar completamente el hipoclorito de sodio y el Tween 20.



Figura 11.- Esquejes sumergidos en hipoclorito.

- Se tomaron los esquejes y se colocaron en papel esterilizado para secar un poco el agua que tenía.
- Con la ayuda de las pinzas se tomó uno por uno los esquejes y se colocaron en los respectivos frascos que contenían los medios de cultivo, diez frascos que contenían en el medio MS y los últimos diez contenían medio AM.



Figura 12.- Esquejes sembrados

- Posteriormente los frascos fueron transferidos al cuarto de cultivo en donde se mantuvieron en total oscuridad por 7 días.
- Pasados los 7 días se retiraron del cuarto oscuro improvisado y se colocaron en las repisas donde se mantuvieron con luz artificial 12 horas luz/día para que los brotes puedan desarrollarse.



Figura 13.- Frascos colocados en repisas con luz artificial 12h/luz/día.

4.8 VARIABLES RESPUESTA

4.8.1 Propagación por estacas

4.8.1.1.1 Vigor de las estacas al inicio del ensayo

Se pudo observar que a los 14 días después de la siembra, las estacas del T2 y T4 empezaron a marchitarse y finalmente a los 29 días después de la siembra todas las estacas de estos tratamientos se marchitaron por completo y murieron. En cuanto a las estacas del T1 a los primeros 14 días se mantuvieron verdes, pasado 2 meses del ensayo, 6 de estacas se mantuvieron verdes y 4 de ellas se encontraron en proceso de marchitez, en el T3 de igual forma a los 2 meses se mantuvieron verdes 7 estacas y 3 estacas se marchitaron.

Esta variable fue medida estableciendo los siguientes rangos:

1: estacas vigorosas

0: estacas marchitas

4.8.1.1.2 Número de brotes

En las estacas del T2 y T3 no se obtuvo ningún brote, ya que estas se marchitaron por completo al mes de iniciar el estudio. Mientras que en los T1 y T3 se obtuvieron brotes en 6 estacas diferentes, al culminar el primer mes de observación se pudo obtener de 1 hasta 5 brotes por estaca que se siguieron desarrollando hasta finalizar el segundo mes en donde se observó que los brotes obtenidos se establecieron y mantenían una apariencia sana.

4.8.1.1.3 Longitud de brote

La longitud del brote se midió a los 15, 30 y 45 días. Se pudo observar que de las 6 estacas que dieron brotes sanos tuvieron medidas de entre 1cm, 2cm, 2,5cm, 3cm, 3,5cm y 5,5cm respectivamente, cada uno se midió con la ayuda de una regla.

4.8.1.1.4 Vigor de la base de las estacas

Al finalizar los dos meses del ensayo se pudo apreciar que las bases de las estacas del T1 empezaron a necrosar, mientras que las bases de las estacas del T3 se mantenían verde y con crecimiento de raicillas. De los T2 y T4 no se obtuvieron resultados de esta variable, ya que como se mencionó anteriormente éstas estacas se secaron al primer mes de haber instalado el ensayo.

Esta variable fue medida estableciendo los siguientes rangos:

1: base de estacas vigorosas

0: base de estacas marchitas

4.8.2 Propagación *in vitro* por esquejes

4.8.2.1.1 Porcentaje de contaminación

Se observó que la contaminación era alta. Después de sacar los frascos del cuarto oscuro y colocarlos a 12 horas luz/día el desarrollo de hongos era más rápido, el problema radicó en que no se pudo encontrar un método adecuado para la desinfección del esqueje, ya que las muestras se obtuvieron de plantas silvestres, más no de una planta establecida bajo condiciones controladas, a los frascos contaminados se los separó y se colocaron en otra repisa, mientras que los frascos no contaminados se siguieron manteniendo bajo condiciones de luz hasta finalizar con el ensayo. Para obtener esta variable se realizó la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de contaminación} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de esplante contaminados}}{\text{n}^\circ \text{ de explantes por tratamiento}} \times 100$$

Esta variable fue medida estableciendo los siguientes rangos:

1: explantes no contaminados

0: explantes contaminados

4.8.2.1.2 Esquejes vigorosos

En los frascos no contaminados, se mantuvieron esquejes vigorosos, es decir, esquejes verdes que mostraban desarrollo de brotes sanos y con posibilidad de que a futuro nazca una nueva planta.

Esta variable fue medida estableciendo los siguientes rangos:

1: esquejes vigorosos

0: esquejes marchitos

4.9 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Los datos de las variables respuestas fueron procesados utilizando el programa estadístico SPSS (versión 26.0). A los datos se comprobaron los criterios de distribución normal (Prueba de Kolmogórov-Smirnov) y de homogeneidad de varianza (prueba de Levene).

CAPÍTULO V

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Obtención plantas de *V. floribundum* en condiciones semicontroladas mediante estacas.

En el primer ensayo se observó el mayor vigor de las estacas en los sustratos compuestos a base de suelo de páramo e Induktor, así como la mezcla de suelo de páramo con Raizal 400 (tabla 1).

Tabla 1. Influencia del tipo de sustrato sobre el vigor de la estaca evaluado al inicio del ensayo

Tratamientos	N	Estaca vigor al inicio	
		Rango promedio	Medias reales
Suelo de páramo + Raizal 400	10	26,00 a	60%
Humus + Raizal 400	10	14,00 b	0%
Suelo de páramo + Induktor	10	28,00 a	70%
Humus + Induktor	10	14,00 b	32,5%

Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas según la prueba H de Kruskal Wallis para $p < 0.05$ ($n=10$)

El proceder para el enraizamiento de las estacas fue similar a lo informado por **Rimachi (2020)**, sin embargo, el mejor resultado que obtuvo este autor fue cuando utilizó aserrín de pino blanco mientras que en nuestro estudio fueron los sustratos compuestos por suelo de páramo más Raizal 400, así como suelo de páramo más Induktor. El uso de la técnica macro propagativa mediante estacas resultó eficiente de modo similar a lo planteado por (**Muñoz 2004**).

A los 15 días no se observaron diferencias estadísticas significativas respecto a la influencia del tipo de sustrato sobre el número de brotes emitidos por las estacas (tabla 2).

Tabla 2. Influencia del tipo de sustrato sobre el número de brotes a los 15 días de montado el ensayo

Tratamientos	N	Número de brotes 15 días	
		Rango promedio	Medias reales
Suelo de páramo + Raizal 400	10	20,50	0
Humus + Raizal 400	10	20,50	0
Suelo de páramo + Induktor	10	20,50	0
Humus + Induktor	10	20,50	0

Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas según la prueba H de Kruskal Wallis para $p < 0.05$ (n=10)

A los 30, 45 y 60 días los tratamientos compuestos por suelo de páramo más Raizal 400 y suelo de páramo con Induktor mostraron un mayor número de brotes (tabla 3, tabla 4 y tabla 5).

Tabla 3. Influencia del tipo de sustrato sobre el número de brotes a los 30 días de montado el ensayo.

Tratamientos	N	Número de brotes 30 días	
		Rango promedio	Medias reales
Suelo de páramo + Raizal 400	10	22,60 a	30%
Humus + Raizal 400	10	18,50 b	0%
Suelo de páramo + Induktor	10	22,40 a	20%
Humus + Induktor	10	18,50 b	12,5%

Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas según la prueba H de Kruskal Wallis para $p < 0.05$ (n=10)

Tabla 4. Influencia del tipo de sustrato sobre el número de brotes a los 45 días de montado el ensayo.

Tratamientos	N	Número de brotes 45 días	
		Rango promedio	Medias reales
Suelo de páramo + Raizal 400	10	22,30 a	20%
Humus + Raizal 400	10	18,50 b	0%
Suelo de páramo + Induktor	10	22,70 a	40%
Humus + Induktor	10	18,50 b	15%

Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas según la prueba H de Kruskal Wallis para $p < 0.05$ (n=10)

Tabla 5. Influencia del tipo de sustrato sobre el número de brotes a los 60 días de montado el ensayo.

Tratamientos	N	Número de brotes 60 días	
		Rango promedio	Medias reales
Suelo de páramo + Raizal 400	10	23,40 a	50%
Humus + Raizal 400	10	17,50 b	0%
Suelo de páramo + Induktor	10	23,60 a	60%
Humus + Induktor	10	17,50 b	27,5%

Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas según la prueba H de Kruskal Wallis para $p < 0.05$ (n=10)

Rodríguez y Morales (2015) determinaron igualmente diferencias significativas en el número de brotes de *Vaccinium* determinando que los factores densidad de explantes y volumen de medio fueron los que mayor influencia tuvieron sobre el número de brotes. Sin embargo, a pesar que en nuestros resultados la variable número de brotes mostró diferencias significativas pero nuestros resultados fueron evaluados en bolsas en lugar del ecosistema *in vitro*. Asimismo, **Rache y Pacheco (2010)** para determinar las mejores condiciones de multiplicación *in vitro* seleccionaron la variable número de brotes.

La longitud del brote a los 15, 30 y 45 días fue mayor en los tratamientos compuestos por suelo de páramo más Raizal 400 y suelo de páramo con Induktor (tabla 6, tabla 7 y tabla 8).

Tabla 6. Influencia del tipo de sustrato sobre la longitud del brote a los 15 días de montado el ensayo.

Tratamientos	N	Longitud del brote establecido 15 días	
		Rango promedio	Medias reales
Suelo de páramo + Raizal 400	10	27,90 a	1,9 %
Humus + Raizal 400	10	10,50 b	0 %
Suelo de páramo + Induktor	10	33,10 a	2,4 %
Humus + Induktor	10	10,50 b	1,08 %

Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas según la prueba H de Kruskal Wallis para $p < 0.05$ (n=10)

Tabla 7. Influencia del tipo de sustrato sobre la longitud del brote a los 30 días de montado el ensayo.

Tratamientos	N	Longitud del brote establecido 30 días	
		Rango promedio	Medias reales
Suelo de páramo + Raizal 400	10	35,50 a	5,5 %
Humus + Raizal 400	10	10,50 b	0 %
Suelo de páramo + Induktor	10	25,50 a	1,25 %
Humus + Induktor	10	10,50 b	1,69 %

Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas según la prueba H de Kruskal Wallis para $p < 0.05$ (n=10)

En relación con la longitud del brote **Hine y Abdelnour (2013)** determinaron que en condiciones *in vitro* el mayor valor lo alcanzaron con el 2ip promovió la mayor longitud de los brotes a diferencia de nuestros resultados donde no se necesitó utilizar citoquininas para estimular el crecimiento de los brotes.

Tabla 8. Influencia del tipo de sustrato sobre la longitud del brote a los 45 días de montado el ensayo.

Tratamientos	N	Longitud del brote establecido 45 días	
		Rango promedio	Medias reales
Suelo de páramo + Raizal 400	10	35,50 a	3,5 %
Humus + Raizal 400	10	10,50 b	0 %
Suelo de páramo + Induktor	10	25,50 a	2 %
Humus + Induktor	10	10,50 b	1,38 %

Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas según la prueba H de Kruskal Wallis para $p < 0.05$ (n=10)

El mayor vigor en la base de la estaca se logró con el tratamiento compuesto a base de suelo de páramo más Induktor, además fue el único donde la base de la estaca no se necrosó (tabla 9).

Tabla 9. Influencia del tipo de sustrato sobre el vigor en la base de la estaca.

Tratamientos	n	Vigor base de la estaca	
		Rango promedio	Medias reales
Suelo de páramo + Raizal 400	10	15,50 b	100% necrosadas
Humus + Raizal 400	10	15,50 b	100% necrosadas
Suelo de páramo + Induktor	10	35,50 a	100% sin necrosis
Humus + Induktor	10	15,50 b	100% necrosadas

Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas según la prueba H de Kruskal Wallis para $p < 0.05$ (n=10)

En relación con la variable vigor en la base de la estaca **Trevisan et al. (2008)** la evaluaron como un indicador de éxito durante el enraizamiento de estacas herbáceas de *Vaccinium* aunque utilizaron como enraizante el ácido indolbutírico lo cual no fue utilizado en nuestro estudio.

5.2 Establecimiento *in vitro* de explantes tomados a partir de plantas silvestres.

En relación con el porcentaje de contaminación del primer ensayo fue similar para ambos medios de cultivo tanto en la primera como en la segunda evaluación. Asimismo, en la tercera evaluación no se observaron diferencias en el porcentaje de explantes vigorosos (tabla 10).

Tabla 10. Influencia del tipo de medio de cultivos sobre el porcentaje de contaminación y de explantes vigorosos en la fase de establecimiento *in vitro* del primer ensayo.

Tratamientos	n	% de contaminación del primer ensayo				% de explantes vigorosos	
		Primera evaluación		Segunda evaluación		Tercera evaluación	
		Suma de rangos	Medias reales	Suma de rangos	Medias reales	Suma de rangos	Medias reales
Medio de cultivo MS	10	105,00	40	105,00	100	105,00	0
Medio de cultivo AM	10	105,00	40	105,00	100	105,00	0

Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas según la prueba U de Mann Whitney para $p < 0.05$ (n=10)

El porcentaje de contaminación del segundo ensayo mostró que el mayor porcentaje de contaminación en la primera evaluación se alcanzó en los frascos de cultivos que contenían el medio de cultivo MS; sin embargo, en la segunda evaluación el mayor porcentaje de contaminación se detectó en el medio AM, en la tercera evaluación no se observaron diferencias en el porcentaje de explantes vigorosos (tabla 11).

El porcentaje de contaminación en el tercer ensayo mostró que el mayor porcentaje de contaminación en la primera evaluación correspondió a los frascos que contenían el medio de cultivo AM. En la segunda no existieron diferencias en el porcentaje de contaminación entre los medios de cultivo MS y AM, con respecto a la tercera

evaluación no se mostró diferencias entre el porcentaje de explantes vigorosos (tabla 12).

Tabla 11. Influencia del tipo de medio de cultivos sobre el porcentaje de contaminación y de explantes vigorosos en la fase de establecimiento *in vitro* del segundo ensayo.

Tratamientos	n	% de contaminación del segundo ensayo				% de explantes vigorosos	
		Primera evaluación		Segunda evaluación		Tercera evaluación	
		Suma de rangos	Medias reales	Suma de rangos	Medias reales	Suma de rangos	Medias reales
Medio de cultivo MS	10	155,00 a	70	55,00 b	80	155,00	100
Medio de cultivo AM	10	55,00 b	40	155,00 a	90	155,00	100

Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas según la prueba U de Mann Whitney para $p < 0.05$ (n=10)

Tabla 12. Influencia del tipo de medio de cultivos sobre el porcentaje de contaminación y de explantes vigorosos en la fase de establecimiento *in vitro* del tercer ensayo.

Tratamientos	n	% de contaminación en el tercer ensayo				% de explantes vigorosos	
		Primera evaluación		Segunda evaluación		Tercera evaluación	
		Suma de rangos	Medias reales	Suma de rangos	Medias reales	Suma de rangos	Medias reales
Medio de cultivo MS	10	55,00 b	50	105,00	100	105,00	0
Medio de cultivo AM	10	155,00 a	90	105,00	100	105,00	0

Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas según la prueba U de Mann Whitney para $p < 0.05$ (n=10)

El porcentaje de contaminación en el cuarto ensayo mostró que el mayor porcentaje de contaminación en la primera evaluación correspondió a los frascos que contenían el medio de cultivo MS. En la segunda evaluación no existieron diferencias en el porcentaje de contaminación entre los medios de cultivo MS y AM, en la tercera evaluación no se mostraron diferencias en el porcentaje de explantes vigorosos tanto para el cultivo MS y AM (tabla 13).

Tabla 13. Influencia del tipo de medio de cultivos sobre el porcentaje de contaminación y de explantes vigorosos en la fase de establecimiento *in vitro* del cuarto ensayo.

Tratamientos	n	% de contaminación del cuarto ensayo				% de explantes vigorosos	
		Primera evaluación		Segunda evaluación		Tercera evaluación	
		Suma de rangos	Medias reales	Suma de rangos	Medias reales	Suma de rangos	Medias reales
Medio de cultivo MS	10	155,00 a	40	105,00	70	155,00	30
Medio de cultivo AM	10	55,00 b	20	105,00	70	155,00	30

Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas según la prueba U de Mann Whitney para $p < 0.05$ (n=10)

El porcentaje de contaminación en el quinto ensayo mostró que el mayor porcentaje de contaminación en la primera y segunda evaluación correspondió a los frascos que contenían el medio de cultivo MS. En la tercera evaluación el mayor porcentaje de explantes vigorosos se mostraron en el cultivo AM (tabla 14).

En relación con la variable porcentaje de contaminación en la fase de establecimiento *in vitro* de plantas del género *Vaccinium*, **Bocanegra et al. (2019)** usaron con mucho éxito esta variable para determinar la eficiencia de la propagación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) a partir de yemas axilares obteniendo solamente de un 15 a un 20% de contaminación. En nuestro estudio los valores elevados del porcentaje de contaminación fueron provocados, ya que se utilizaron

explantes directamente tomados de plantas originadas a partir de estacas de condiciones de campo. En especies como *Vaccinium corymbosum* también se ha utilizado con éxito la variable porcentaje de contaminación como indicador de eficiencia en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales en medio de cultivo semisólido (Toapanta 2021).

Tabla 14. Influencia del tipo de medio de cultivos sobre el porcentaje de contaminación y de explantes vigorosos en la fase de establecimiento *in vitro* del quinto ensayo.

Tratamientos	% de contaminación del quinto ensayo				% de explantes vigorosos		
	n	Primera evaluación		Segunda evaluación		Tercera evaluación	
		Suma de rangos	Medias reales	Suma de rangos	Medias reales	Suma de rangos	Medias reales
Medio de cultivo MS	10	155,00 a	20	155,00 a	60	55,00 b	20
Medio de cultivo AM	10	55,00 b	10	55,00 b	30	155,00 a	50

Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas según la prueba U de Mann Whitney para $p < 0.05$ (n=10)

CAPÍTULO VI

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

Al finalizar esta investigación se pudo determinar que el método por estacas fue el más eficiente que el método *in vitro* para la propagación de *V. floribundum*.

Mediante el método de estaquillado se obtuvieron plantas de *V. floribundum* en condiciones semicontroladas, en donde se logró observar que las estacas que estuvieron con el tratamiento de suelo de páramo fueron las que más tiempo sobrevivieron manteniéndose verde y desarrollando nuevos brotes. Las estacas que tuvieron el tratamiento de humus no lograron sobrevivir ya que no se adaptaron al tipo de suelo, finalmente terminaron por marchitarse entre las primeras cuatro semanas.

A partir de segmentos nodales de plantas de *V. floribundum* se logró establecer *in vitro* explantes tomados a partir de plantas silvestres, que mantuvieron su vigor y no se contaminaron. Cabe recalcar que este método de propagación no es conveniente, porque lo que se busca es un desarrollo rápido y como se pudo observar en tres meses de pruebas en laboratorio no se alcanzó obtener un tamaño apropiado para las plantas.

6.2 RECOMENDACIONES

Establecer un banco de plantas donantes bajo condiciones semicontroladas para garantizar calidad fisiológica y fitosanitaria de los explantes.

Probar otros explantes de plantas donantes de *V. floribundum*.

Identificar los microorganismos causantes de la contaminación en la fase de establecimiento in vitro.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara, J; Acero, J; Alcántara, D; Sánchez, R. 2019. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal (en línea). *Revista Scielo* 17(32):109-129. Consultado 10 ago. 2021. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>.
- Antama. 2017. La hormona vegetal citoquinina regula el crecimiento y desarrollo de las plantas (en línea, sitio web). Consultado 10 ago. 2021. Disponible en <https://fundacion-antama.org/la-hormona-vegetal-citoquinina-regula-el-crecimiento-y-desarrollo-de-las-plantas/>.
- Argudo, A. 2017. Desarrollo y estandarización de marcadores microsatélites específicos para mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) (en línea). Tesis Ing. Bio. Quito, Ecuador, USFQ. Consultado 21 jul. 2021. Disponible en <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6960/1/136066.pdf>.
- Lerma, L; García, D; Niño, W; Díaz W. 2019. Propagación in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) a partir de yemas axilares (en línea). *Revista Siembra CBA*, (2), 9–19. Consultado 08 sep. 2021. Disponible en <http://revistas.sena.edu.co/index.php/Revsiembracba/article/view/3547>.
- Chamorro, G. 2019. Determinación de métodos de propagación sexual y asexual del mortiño (*Vaccinium floribundum*) con fines de conservación de la especie (en línea). Tesis In. Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo. Ibarra, Ecuador, PUCE. Consultado 03 ago. 2021. Disponible en <https://dspace.pucesi.edu.ec/bitstream/11010/423/1/1.%20TESIS%20%28GRACE%20CAROLINA%20CHAMORRO%20GARCIA%29.pdf>
- 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 (en línea). *Revista de Ciencias de la Vida* 16(2):5-13. Consultado 02 ago. 2021. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/4760/476047400002.pdf>.

- El Mundo. 2007. El Mortiño (en línea, sitio web). Consultado 10 ago. 2021. Disponible en <https://www.elmundo.com/portal/resultados/detalles/?idx=43944>
- Fichet, T. 2017. Hormonas vegetales y reguladores de crecimiento (en línea, sitio web). Consultado 10 ago. 2021. Disponible en <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/biosintesis-de-las-fitohormonas-y-reguladores-de-crecimiento>.
- Gallardo, C. 2015. Mortiño: La perla de los Andes (en línea). Quito, Ecuador. 92 p. Consultado 12 jul. 2021. Disponible en https://issuu.com/quito_turismo/docs/mortino-perla-andes.
- Hagiwara, J; Sisaro, D. 2016. Propagación vegetativa por medio de estacas de tallo (en línea). Hurlingham, Buenos Aires. p 2. Consultado 26 ago. 2021. Disponible en https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-propagacion_vegetativa_por_medio_de_estacas_de_tallo.pdf
- Hine, A; Abdelnour, A. 2013. Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L) (en línea). Revista tecnología en Marcha 26(4), ág-64. Consultado el 08 sep. 2021. Disponible en https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1584.
- Intagri (Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura). 2021. Cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetal (en línea, sitio web). Consultado 10 ago. 2021. Disponible en <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetal>.
- Loor, J; Zambrano, A. 2016. Estudio del Mortiño, Beneficios, y Aplicación en la Repostería (en línea). Tesis Lic. Gastronomía. Guayaquil, Ecuador, UG. Consultado 03 ago. 2021. Disponible en <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/14886/1/TESIS%20Gs.%20135%20-%20Estudio%20del%20morti%C3%B1o%20beneficios%20y%20aplicaci%C3%B3n%20en%20la%20Reposter%C3%ADa.pdf>.

- Mayorga, M. 2012. Estudio del efecto de la deshidratación por aire sobre la capacidad antioxidante del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt) (en línea). Tesis Ing. Alimentos. Quito, Ecuador, UTE. Consultado 10 ago. 2021. Disponible en http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/4988/1/51191_1.pdf
- Muñoz, V. 2004. Determinación de métodos para producción de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), con fines de propagación y producción comercial (en línea). Tesis Ing. Agroempresas. Quito, Ecuador, USFQ. Consultado 29 jul. 2021. Disponible en <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/864/1/75820.pdf>
- Rache, L; Pacheco, J. 2010. Propagación in vitro de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae) (en línea). *Acta Botanica Brasílica*, 24, 1086-1095. Consultado 08 sep. 2021. Disponible en <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062010000400024>
- Recto, L. 2018. Micropropagación de plántulas de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) bajo condiciones *in vitro* (en línea). Tesis Ing. Agroindustrial y de Alimentos. Consultado 21 jul. 2021. Disponible en <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/10389/1/UDLA-EC-TIAG-2018-53.pdf>.
- Rimachi, E. 2020. Evaluación de cuatro sustratos para el enraizamiento de estacas de dos ecotipos de "pushgay" (*Vaccinium floribundum* Kunth) mediante el uso del ácido Indol-3-Butirico (en línea). Tesis. La Molina, Perú, UNAM. Consultado 08 sep. 2021. Disponible en <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/4420>.
- Rodríguez, M; Morales, D. 2015. Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo sobre la multiplicación in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedades Brigitta y Legacy (en línea). *Revista Scientia Agropecuaria* 6(1):31-40. Consultado 08 sep. 2021. Disponible en http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172015000100003.
- Rojas, S; García, J; Alarcón, M. 2004. Propagación asexual de las plantas: conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas (en línea). Bogotá, Colombia.

30 p. Consultado 10 ago. 2021. Disponible en <file:///C:/Users/HP/Downloads/018.1.pdf>.

Trevisan, R; Franzon, R; Fritsche, R; Gonçalves, S; Gonçalves, D; Antunes, C. 2008. Enraizamiento de estacas herbáceas de mirtilo: influência da lesão na base e do ácido indolbutírico (en línea). *Ciência e Agrotecnologia*, 32, 402-406. Consultado 08 sep. 2021. Disponible en <https://www.scielo.br/j/cagro/a/9vVG75RQnyBSyzJ7fGyRCdh/?lang=pt>.

Trujillo, D. 2008. Cultivo *in vitro* del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) (en línea). Tesis B.S. Bio. Quito, Ecuador. USFQ. Consultado 02 ago. 2021. Disponible en <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/794/1/91202.pdf>.

Universidad Nacional de Colombia. 2019. COL000220171- *Vaccinium floribundum* Kunth- Ericaceae (en línea, sitio web). Consultado 03 ago. 2021. Disponible en <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/350920/>.

USFQ (Universidad San Francisco de Quito). 2016. La USFQ empeñada en preservar el Mortiño (en línea, sitio web). Consultado 12 jul. 2021. Disponible en http://conexiones.usfq.edu.ec/index.php/389-la-usfq-empenada-en-preservar-el-mortino?fb_comment_id=1285498118130983_1665224183491706.

ANEXOS

Anexo 1. Recolección de material vegetal



Anexo 2. Instalación ensayos por estacas



Anexo 3. Preparación de medios de cultivo MS y AM



Anexo 4. Instalación ensayo *in vitro*



Anexo 5. Desarrollo de brotes en sayo por estacas



Tratamiento 1 suelo de páramo + Raizal 400



Tratamiento 2 suelo de páramo + Induktor

Anexo 6. Esquejes *in vitro* vigorosos sin contaminación



Anexo 7. Estacas del tratamiento 2 y 4



Anexo 8. Estacas tratamiento 1 y 3

