

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“EFECTO DE CITOQUININAS EN EL CULTIVO *In vitro* DE DOS  
ESPECIES DE BERRIES NATIVOS DEL PERÚ: *Vaccinium  
floribundum* Kunth «pushgay» Y *Macleania rupestris* Kunth A.C. Smith  
«alicon»”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
BIÓLOGA**

**YNGRID DE LA CRUZ CHACON**

**LIMA-PERÚ**

**2020**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“EFECTO DE CITOQUININAS EN EL CULTIVO *In vitro* DE DOS  
ESPECIES DE BERRIES NATIVOS DEL PERÚ: *Vaccinium  
floribundum* Kunth «pushgay» Y *Macleania rupestris* Kunth A.C. Smith  
«alicon»”**

Presentada por:

**Yngrid De la Cruz Chacon**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGA**

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

---

Dr. Alfredo Rodríguez Delfín  
**PRESIDENTE**

---

Mg. Sc. Abelardo Ciro Calderón Rodríguez  
**MIEMBRO**

---

Mg. Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa  
**MIEMBRO**

---

Dra. Antonietta Ornella Gutiérrez Rosati  
**ASESORA**

## **AGRADECIMIENTO**

A la profesora Antonietta Gutiérrez Rosati, asesora, por su apoyo constante en la realización y orientación de la presente investigación.

Al proyecto “Domesticación de berries nativos de la región Cajamarca, relacionados al arándano, mediante el uso de herramientas biotecnológicas”, contrato 009-2016-INIA-PNIA/UPMSI/IE, por el financiamiento de la tesis.

A mis amigos del Centro de Investigación de Recursos Genéticos, Biotecnología y Bioseguridad (CIRGEBB), quienes me apoyaron en el proceso de realización de la tesis; y al técnico del laboratorio cuyas atenciones facilitaron mi trabajo en todo momento.

A mis padres y hermanas por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	vi
ABSTRACT .....	vii
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Familia Ericaceae .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Género <i>Vaccinium</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.1. <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Género <i>Maclania</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.1. <i>Maclania rupestris</i> Kunth A. C. Smith .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4. Cultivo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4.1. Factores que intervienen en el cultivo de tejido .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4.2. Propagación de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth .....</b>	<b>13</b>
<b>2.4.3. Propagación de <i>Maclania rupestris</i> Kunth A. C. Smith .....</b>	<b>13</b>
<b>2.5. Citoquinina .....</b>	<b>14</b>
<b>2.5.1. Efectos fisiológicos .....</b>	<b>15</b>
<b>2.5.2. Mecanismos de acción .....</b>	<b>16</b>
<b>III. METODOLOGÍA .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Materiales .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.1. Material vegetal .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.2. Medio de cultivo .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.3. Reguladores de crecimiento .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.4. Materiales del laboratorio .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.5. Equipos .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Métodos .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.1. Preparación de medios de cultivos .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.2. Homogenización .....</b>	<b>19</b>

3.2.3.	Instalación de los experimentos.....	19
3.2.4.	Descripción de la unidad experimental .....	20
3.2.5.	Análisis estadísticos .....	20
3.2.6.	Variables respuesta .....	20
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	21
4.1.	Longitud del explante .....	22
4.2.	Número de Brotes .....	24
4.3.	Número de hojas .....	27
4.4.	Número de raíces .....	32
V.	CONCLUSIONES.....	36
VI.	RECOMENDACIONES .....	37
VII.	BIBLIOGRAFÍA .....	38
VIII.	ANEXOS.....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Descripción taxonómica de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth .....	5
<b>Tabla 2:</b> Descripción taxonómica de <i>Macleania rupestris</i> Kunth A. C. Smith.....	9
<b>Tabla 3:</b> Promedio de los resultados de las variables a los 60 días de la siembra.....	21
<b>Tabla 4:</b> Promedio de los resultados de las variables a los 120 días de la siembra.....	22

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Efecto de la interacción entre especie y tratamiento para la longitud del explante a los 120 días de la siembra.....	23
<b>Figura 2:</b> Efecto de la interacción entre especie y tratamiento para el número de brotes a los 120 días de la siembra .....	25
<b>Figura 3:</b> Efecto de la interacción entre especie y tratamiento para el número de hojas a los 120 días de la siembra.....	28
<b>Figura 4:</b> Desarrollo de “pushgay” ( <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth) en medio de cultivo con diferentes reguladores de crecimiento A: medio control, B: Zeatina 0.5ppm, C: Kinetina 0.5ppm, D: Kinetina 1.0ppm.....	30
<b>Figura 5:</b> Desarrollo de “alicon” ( <i>Macleania rupestris</i> Kunth A. C. Smith) en medio de cultivo con diferentes reguladores de crecimiento A: medio control, B: Zeatina 0.5ppm, C: Kinetina 0.5ppm, D: Kinetina 1.0ppm. ....	31
<b>Figura 6:</b> Efecto de la interacción entre especie y tratamiento para el número de raíces a los 120 días de la siembra.....	33
<b>Figura 7:</b> Crecimiento de raíces de “pushgay” ( <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth) en medio de cultivo con diferentes reguladores de crecimiento A: medio control, B: Zeatina 0.5ppm, C: Kinetina 0.5ppm, D: Kinetina 1.0ppm. ....	34
<b>Figura 8:</b> Crecimiento de raíces de “alicon” ( <i>Macleania rupestris</i> Kunth A. C. Smith) en medio de cultivo con diferentes reguladores de crecimiento A: medio control, B: Zeatina 0.5ppm, C: Kinetina 0.5ppm, D: Kinetina 1.0ppm.....	35

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Medio de cultivo Woody Plant.....	48
<b>Anexo 2:</b> Resultados totales de cada unidad experimental a los 60 días de siembra.....	49
<b>Anexo 3:</b> Resultados totales de cada unidad experimental a los 120 días de siembra.....	51
<b>Anexo 4:</b> Prueba estadística a los 60 días de siembra.....	53
<b>Anexo 5:</b> Prueba estadística a los 120 días de siembra.....	55
<b>Anexo 6:</b> Fotos de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth .....	57
<b>Anexo 7:</b> Fotos de <i>Macleania rupestris</i> Kunth A. C. Smith.....	61



## RESUMEN

Los berries nativos del Perú poseen un elevado valor nutritivo; sin embargo, solo algunas han sido domesticadas. Presentan caracteres muy variables como frutos de diferentes tamaños, calidad y sabor que hacen de estas especies un banco genético muy importante para los programas de mejoramiento. El objetivo del presente trabajo es evaluar el crecimiento *in vitro* de dos especies de berries nativos del Perú como *Vaccinium floribundum* Kunth y *Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith, conocidas como “pushgay” y “alicon”, respectivamente; utilizando diferentes medios de cultivos, suplementado con diferentes concentraciones de citoquininas (zeatina y kinetina). El medio de cultivo basal utilizado fue el medio de Lloyd y McCown (1980), conocido como Woody Plant (WP) y como reguladores de crecimiento, soluciones madre de zeatina 1000 ppm y kinetina 1000 ppm. Se trabajó en un ambiente controlado de crecimiento, con temperatura de 22 °C +/- 2°C, fotoperíodo de 8/16 horas y luminosidad de 47,74  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . El diseño experimental fue el completamente al azar (DCA) con cuatro tratamientos y siete repeticiones, durante un periodo de 120 días. Las variables respuestas fueron longitud del explante, número de hojas, número de brotes y número de raíces. Los datos obtenidos fueron analizados por análisis de varianza simple (ANOVA) y la prueba de Tukey, donde se obtuvo diferencias significativas en cada una de las variables respecto a los tratamientos aplicados. Se observó que las características fenotípicas fueron mejores en los tratamientos suplementados con kinetina, obteniéndose explantes con mayor longitud, entrenudos más largos, con hojas más verdes y presencia de raíz; a diferencia con la zeatina, en donde solo se observaron callos. Se concluyó que el mejor medio de propagación para “pushgay” es el medio suplementado con kinetina 1.0 ppm y para “alicon” es el medio suplementado con kinetina 0.5 ppm.

Palabras claves: micropropagación, “pushgay”, “alicon”, *Vaccinium floribundum*, *Macleania rupestris*.

## ABSTRACT

Peruvian native berries have a high nutritional value; however, only few of them have been domesticated. Their fruits have different sizes, quality and flavor that make these species a very important genetic bank for breeding programs. The objective of this research is to assess the *in vitro* propagation of two species of Peruvian native berries, namely, *Vaccinium floribundum* Kunth and *Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith -known as “pushgay” and “alicon”, respectively- using different culture media, supplemented with different cytokinin concentrations (zeatin and kinetin). The basal culture medium used was Lloyd and McCown’s medium (1980), known as Woody Plant (WP), and, as growth regulators, stock solutions of zeatin 1000 ppm or kinetin 1000 ppm. Work was carried out in a controlled environment, with a temperature of 22 °C +/- 2 °C, photoperiod of 8/16 hours and 47.74  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  luminosity. The experimental design used was a completely random (DCA), involving four treatments and seven repetitions, during a period of 120 days. The response variables were length of the explant, number of leaves, number of shoots and number of roots. The data were analyzed by a simple variance analysis (ANOVA) and Tukey test, where significant differences were obtained in each of the variables. It was observed that the treatments supplement with kinetin were better, resulting in explants with longer length, longer internodes, greener leaves and root presence, whereas in the treatment with zeatin, only calluses were observed. It was concluded that the propagation medium for “pushgay” is the one supplemented with 1.0 ppm kinetin and, for “alicon” the medium supplemented with 0.5 ppm kinetin.

**Keywords:** micropropagation, “pushgay”, “alicon”, *Vaccinium floribundum*, *Macleania rupestris*.

## I. INTRODUCCIÓN

La familia Ericaceae es considerada como una de las familias más representativas ya que cuenta con gran número de géneros y especies presentes en los ecosistemas de páramo y bosques andinos, ésta cuenta con alrededor de 125 géneros y 4500 especies identificadas a lo largo del planeta y están presentes en todos los continentes a excepción de la Antártida (Luteyn, 2007; Salinas y Betancourt, 2005). Esta familia posee una distribución amplia a nivel de cuatro centros de alta biodiversidad ubicadas en Australia, Himalaya, Sur de África y en los Neotrópicos (Luteyn y Pedraza, 2008). Las Ericaceas se caracterizan por ser arbustos rastreros o erguidos de pequeño a mediano porte cuyos frutos son comestibles, tanto para el hombre como para la fauna del ecosistema (Salinas y Betancourt, 2005).

Dentro de la familia Ericaceae se encuentran los así llamados “berries nativos del Perú”, *Vaccinium floribundum* Kunth y *Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith. La primera especie es conocida en Perú como “pushgay”, se distribuye naturalmente en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú (Luteyn, 2002). La segunda especie es conocida como “alicon” y se encuentra distribuida a lo largo de Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú, ocupando nichos desde los 2000 msnm hasta los 4267 msnm (Mora, 1987).

El “pushgay” es un arbusto rastrero, perenne, longevo, miden de 30 cm hasta 2 metros de altura (Tapia y Fries, 2007). Las hojas son alternas, miden hasta 2 cm de largo, coriáceas, lanceoladas, de borde aserrado (Palacios, 1982). La inflorescencia se presenta en racimos de 6 a 10 flores, los frutos son bayas pequeñas redondas que están dispuestas en racimos, son de color azul-violáceo. Su raíz alcanza a medir un metro y siempre está dispuesta o crece en forma horizontal (Tapia y Fries, 2007). Según Tapia y Fries (2007), se diferencian claramente hasta cuatro variedades comestibles: “pushgay negro”, “pushgay colorado”, “pushgay menudo” y “pushgay blanco”, una variedad que es toxica llamada mio mio.

“Alicon” es un arbusto de 1 a 5 metros de altura, ramificado con ramas largas hasta 2.5 metros y tallos subterráneos de reserva; hojas grandes ovadas a elípticas con nervadura acródoma (Abril, 2010; Fernández, 2012); inflorescencia racimosa con flores tubulares rojas con el borde blancuzco; el fruto carnosos es una baya morado-transparente a negro de 0.8 a 1.5 cm de diámetro y 1.5 a 3.5 gramos por fruto con abundante semilla pequeña; la pulpa tiene un color claro con sabor dulce y agradable (De Valencia y De Carrillo, 1991; JBJCM, 2006).

Los frutos de estas dos especies son muy importantes debido a las propiedades nutricionales y su elevado valor nutritivo, contiene fotoquímicos que pueden reducir el riesgo de enfermedades crónicas (Pennington y Fisher, 2009), como son la presencia de antocianinas que le confieren el color al fruto y son reconocidas como sustancias con propiedades antioxidantes y que intervienen en el metabolismo celular humano disminuyendo la acción de los radicales libres, asociados al envejecimiento, cáncer, enfermedades cardíacas y Alzheimer (Coria *et al.*, 2008). Según el Diario Gestión (2017), la Dra. Antonietta Gutiérrez Rosati detalló que se han analizado muestras de frutos de “pushgay”, encontrándose que contiene hasta tres veces más antioxidantes que para los frutos de arándanos que actualmente se comercializan en el mercado, lo cual, hace al “pushgay” un producto de alto valor comercial. En el caso del “alicon” ha sido denominada como especie promisorias de los ecosistemas de alta montaña por sus propiedades alimenticias y medicinales en el convenio Andrés Bello propuesto en el año 2003 (Acero y Bernal, 2003).

Los frutales nativos como las especies mencionadas, han sido utilizados por todas las culturas desde tiempos inmemoriales; sin embargo, solo algunos han sido domesticados, la mayoría continúan en estado silvestre (Sanjinés *et al.*, 2006).

En los últimos años se ha prestado atención sobre la importancia comercial de las especies en mención, planteándose la necesidad de dar inicio a un programa de mejoramiento genético y domesticación. Para ello es importante estudiar metodologías que permitan propagar vegetativamente a estas especies como lo dijo la Dra. Antonietta Gutiérrez Rosati (Comunicación personal, 16 de mayo del 2019).

Las técnicas de propagación clonal se conocen y aplican en números cultivos, la propagación a través del cultivo *in vitro* ofrece ventajas frente a la propagación vegetativa tradicional, como son: velocidad en la obtención de individuos, permite producir plantas libres de

patógenos a lo largo de todo el año y mantener colecciones de germoplasma de respaldo (González *et al.*, 2000; Ostrolucká *et al.*, 2004; Reed y Abdelnour-Esquivel 1991).

La aplicación de la técnica de micropropagación requiere en primer lugar estandarizar determinados protocolos y lo que es más importante conseguir la formulación más óptima del medio de cultivo óptimo. La presente investigación se ocupa precisamente de esto último, mediante la optimización del uso de citoquininas en el medio de cultivo *in vitro* ya que posee un valor comercial muy importante.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Familia Ericaceae

En la familia Ericaceae se encuentran aproximadamente 125 géneros, dentro de los cuales hay 4500 especies en el mundo (Luteyn, 2007). Los géneros más representativos son *Cavendishie* (150 spp.), *Thibaudia* (60 spp.), *Psammisie* (60 spp.), *Vaccinium* (450 spp.), *Maclenia* (40 spp.), *Disterigma* (40 spp.), *Gaylussacia* (40 spp.), *Gualtheria* (37 spp.) y *Ceratosteme* (34 spp.), (Huamantupa, 2008).

Botánicamente las Ericaceas se conocen por ser arbustos pequeños de hasta 3.5 m de altura con hojas pequeña, coriáceas, elípticas a ovado lanceoladas, márgenes finamente aserrados y generalmente perennes. Las inflorescencias son racimos que salen de las axilas de los tallos y hojas, con 6 a 10 flores pequeñas con simetría radial con un cáliz de 4-6 sépalos libres, corola 4-5 pétalos unidos en forma de tubo, estambres generalmente el doble que los sépalos con las anteras en posición invertida; un ovario supero (a excepción del género *Vaccinium*); corola con forma de olla de color blanco, rosa o rojo. El fruto es una capsula o baya esférica de 5 a 8 mm de diámetro (Infoagro, 2009).

### 2.2. Género *Vaccinium*

El género *Vaccinium* es uno de los más grandes con 450 especies distribuidas desde Asia hasta los Andes. En América, este género se encuentra geográficamente distribuido en zonas tropicales donde alcanza su mayor diversidad; encontrándose al noreste de Sur América (Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Venezuela), en donde han sido descritas 40 especies, las que se desarrollan entre los 1400 a 4350 msnm en paramos y bosques húmedos montanos (Sanjinés *et al.*, 2006).

Las especies de este género son arbustos siempre verdes que varían de tamaño, desde porte muy bajo de 0,3 m hasta 5,0 m de altura, pudiendo ser plantas de porte erecto o rastrero. El

sistema radicular se compone de una red de raíces superficiales que al envejecer se cubre con una fina corteza gris. Las hojas son alternas, dentadas o aserradas, con peciolo cortos, pueden ser caducas o perennes, ovales o lanceoladas y poseen estomas solo en el envés; las flores son pedunculadas, pueden ser terminales o axilares y presentarse solitarias o en racimos, con diferentes tonos como blanco, rosado poco intenso y rojo, el ovario es ínfero porque está unido al cáliz que tiene e cuatro a cinco dientes. La corola es acampanada y se compone de cuatro a cinco lóbulos, mientras que el androceo presenta de ocho a diez estambres. El fruto desarrollado a partir de un ovario ínfero se clasifica como una falsa baya, tiene un diámetro de 5 mm a 16 mm; en un principio presentan una coloración verdosa pálida, luego purpura rojiza y finalmente durante la maduración oscurecen completamente, tiene un sabor dulce cuando son maduros, con grado de acidez variable (Huxley, 1992).

### **2.2.1. *Vaccinium floribundum* Kunth**

#### **2.2.1.1. Origen y distribución**

Se encuentra presente en el Neotrópico se concentran en el noreste de Sur América (Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) (Dávila, 2001). En el Perú, el “pushgay” se registró en los departamentos de San Martín, Piura, Amazonas, Ancash, Cajamarca, La Libertad, Lambayeque y Cusco. Específicamente en las provincias de Cajamarca, Chota, San Marcos, Cutervo, Celendin, Hualgayoc y Santa Cruz en el departamento de Cajamarca (Rázuri, 2014).

#### **2.2.1.2. Taxonomía**

La clasificación taxonómica de *V. floribundum* Kunth es la siguiente:

**Tabla 1:** Descripción taxonómica de *Vaccinium floribundum* Kunth

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

Nombres comunes en Ecuador “uva de los andes”, “mortiño”, “uva del monte”, “manzanilla del cerro”, “raspadura del monte”; en Colombia “agraz” (Noboa, 2010); y en Perú “pushgay”, “macha macha”, “congama”, “pushgay lanudo”, “pushgay negro”, “pushgay colorado”, “pushgay blanco”, “pirigay”, “pushgay menudo”.

### **2.2.1.3. Descripción botánica**

El *V. floribundum* Kunth es un arbusto rastrero, perenne, longevo, miden de 30 cm hasta 2 metros de altura (Tapia y Fries, 2007). Las hojas son alternas, miden hasta 2 cm de largo, coriáceos, lanceolados, de borde aserrado (Palacios, 1982). La inflorescencia se presenta en racimos de 6 a 10 flores, miden hasta 1,5 cm de largo. Las flores son pendulares de hasta 8 mm de largo, la corola es cilíndrica con 4 o 5 dientes obtusos, de color blanco al inicio y se tornan moradas cuando va a empezar la fructificación. Los frutos son bayas pequeñas redondas que están dispuestas en racimos, son de color azul-violáceo y su jugo es de color púrpura, a veces con una cubierta cerosa y su jugo es de color púrpura. A raíz alcanza a medir un metro y siempre está dispuesta o crece en forma horizontal. Es perenne y empieza a florecer con el inicio de épocas de lluvia (Tapia y Fries, 2007).

### **2.2.1.4. Variedades**

Según Tapia y Fires (2007), existen 6 variedades de “pushgay”:

#### **- “pushgay negro grande”**

Esta variedad alcanza un tamaño y color parecido al saúco, es de sabor muy dulce, contiene bastante pulpa y tiene un mayor contenido de materia seca y azúcar.

#### **- “pushgay colorado grande”**

Se caracteriza por un tamaño y color parecido a la uva roja y es de un sabor dulce agradable, contiene buena cantidad de pulpa y también tiene un mayor contenido de materia seca y azúcar.

#### **- “pushgay menudo”**

Puede ser de color negro o colorado (sangre de toro); pero es de tamaño muy pequeño con residuos de la flor. Tiene poco contenido de líquido, pero si un alto contenido de azúcar, es muy dulce y oloroso; su rendimiento en pulpa y materia seca es menor, debido a la fibra o cutícula de la piel.



- **“pushgay blanco”**

Es de tamaño algo grande y la piel y pulpa son de color blanco verdoso brillante, y tiene un sabor similar a la manzana. El tallo es de color blanco, con hojas verdosas blanquecinas y los tallos y hojas son más largos; este “pushgay” generalmente produce grandes racimos de frutos.

- **“pushgay” no comestible tóxico, llamado mío mío.**

Esta variedad produce frutos más grandes, semiplanos o achatados y muy parecidos al saúco, de color rojo oscuro (como sangre de toro) y raras veces adquieren un color negro. El tamaño de la planta es muy pequeño, es frondosa, ramificada o coposa y siempre se mantiene erecta; las hojas son más angulares y de un color verde amarillento oscuro. Esta especie se adapta o se encuentra preferentemente en lugares húmedos, pero siempre junto a las otras especies de “pushgay”, donde hay presencia de ichu y chimchango que es un arbusto propio de estos ecosistemas. El mío mío no debe ser consumido ni por los animales ni por los seres humanos; cuando se ingiere accidentalmente, ocasiona intoxicación y en los animales puede llegar a causar la muerte debido al alto contenido de cianuro.

#### **2.2.1.5. Usos**

El fruto de “pushgay” está incluido dentro de los conocidos “frutos del bosque”, los cuales tienen propiedades hipocalóricas, antioxidantes, nutritivas y medicinales, entre otras (Fuentes, 2008). Los frutos y hojas de las especies de *Vaccinium* han sido usados históricamente con fines medicinales por nativos norteamericanos para combatir infecciones urinarias, cálculos del riñón, inflamaciones, como diurético y como astringente. Las antocianinas, que le confieren el color azul al fruto, intervienen en el metabolismo celular humano disminuyendo la acción de los radicales libres, asociados al envejecimiento, cáncer, enfermedades cardíacas y Alzheimer (Coria *et al.*, 2008).

Los frutos desecados se usan para calmar la diarrea, las hojas se toman en infusión, pues contienen arbutina que puede controlar la diabetes (ASPADERUC, 1997). Como alimento, los frutos se consumen en fresco, como complemento en ensaladas de frutas, vegetales y mezclados con cereales y yogurt. Por su sabor fuerte y agradable se lo utiliza en la preparación de salsas, acompañamientos para diversos platos de carnes y preparaciones de tipo gourmet, mermeladas, salsas para pancakes, waffles y pastelería variada. En la industria, son empleados en la fabricación de tintes, tinturas y combustibles (Sanjinés *et al.*, 2006).

### **2.3. Género *Macleania***

Las especies de dicho género pueden ser arbustos desordenados a compactos, terrestres o epifitos, hojas alternas coriáceas continuo márgenes enteros, venación pinnada, inflorescencia axilar o terminal, generalmente racemosas o subfaciculadas, con pocas a muchas flores, raramente flores solitarias. Flores pentameras, sin olor, estivación valvada, cáliz usualmente articulado con el pedicelo, raramente cáliz continuo, hipanto cilíndrico corto a campanulado, a veces angulado o conspicuamente alado. Lóbulos triangulares, erectos después de la antesis, corola carnosas, elongada-urceolda a cilíndrica, presentan 10 estambres, ovario ínfero, estilo filiforme tan largo como la corola o un poco más, fruto en baya, generalmente esférico, negro azulado o blanco traslucido, semillas algunas veces con cubierta mucilaginosa, embrión algunas veces verde (Hooker, 1837).

#### **2.3.1. *Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith**

##### **2.3.1.1. Origen y distribución**

*Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith es una especie endémica de los Andes que crecen en estado silvestre. Se encuentra distribuida en la vertiente occidental de la Cordillera Oriental y a ambos lados de la Cordillera Occidental de los Andes, entre 2500 a 3400 msnm (Van den Eynden *et al.*, 1999). Se encuentra en bosques, robledas, encenillales, matorrales y páramos; también en bordes de caminos y linderos. Puede crecer en sitios muy pendientes y escarpados, en suelos ácidos y sobre afloramientos rocosos (Luteyn y Pedraza, 2008). Esta especie se encuentra distribuida ampliamente desde Perú hasta el sur de México (Luteyn, 2007).

##### **2.3.1.2. Taxonomía**

La clasificación taxonómica de *M. rupestris* Kunth A. C. Smith es la siguiente:

**Tabla 2:** Descripción taxonómica de *Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Ericales
<b>Familia:</b>	Ericaceae
<b>Género:</b>	Macleania
<b>Especie:</b>	<i>Macleania rupestris</i> Kunth A. C. Smith

Nombres comunes en Venezuela “cacagüito”; en Ecuador “jopaya”, “gualicón”, “lucho”, “ilucho”, “gualicón”; Colombia: “uva camarona”, “uvita”, “chanquilulo”, “uvo”, “hualicón llucho”, “cacagüito”, “hualicón llucho” (Acero y Bernal, 2003; Bernal *et al.*, 2011) y en Perú: “alicon”, “manzanita”.

#### **2.3.1.3. Descripción botánica**

*Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith es un arbusto perenne de 0,6 a 3 m de altura con ramificaciones casi desde la base del tallo (Acero y Bernal, 2003; Cardozo *et al.*, 2009; Lagos-Burbano *et al.*, 2010). En ciertas ocasiones esta especie sobrevive junto con árboles altos y sus ramas ascienden simulando a una especie bejucosa. Resiste a los vientos y heladas y requiere una gran exposición al sol (Rodríguez y Peña, 1984). Los tallos poseen una corteza clara, escamosa semi-escandente. Las hojas juveniles tienen una tonalidad de color rojo y verde claro en su madurez, alternas, carnosas y coriáceas (Cardozo *et al.*, 2009). Sus inflorescencias son racemosas axilares con 4 a 20 flores; se distingue por tener flores con sépalos cortos, sus flores son en forma de campana con un perianto y pedúnculo de color rosa a rojo (De Valencia y De Carrillo, 1991; Cardozo *et al.*, 2009; Lagos-Burbano *et al.*, 2010 y Van den Eynden *et al.*, 1999). Sus frutos son carnosos, dulces, presentan un color morado-negro o rosado semejantes a las uvas de 10 a 12 mm de diámetro con numerosas semillas pequeñas (98-150) (Van den Eynden *et al.*, 1999 y Cerón, 1993). Su raíz es simple, delgada y a veces presenta una estructura lignificada semi-redonda (Boni, 2016).

#### **2.3.1.4. Usos**

Esta especie aporta usos de gran importancia dentro de la medicina popular ya que sus frutos, hojas y flores son utilizados contra la disentería, diarrea crónica y también como astringente

y laxante (Lagos-Burbano *et al.*, 2010). Sus frutos son empleados en la obtención de colorantes y en la elaboración de mermeladas, salsas, néctares, vinos, uvas, pasas, caramelos, licores, entre otros. Las hojas se usan en la elaboración de cosméticos, por su contenido de taninos (Corzo y Torres, 2011).

También se caracteriza por ser una especie colonizadora de áreas naturales o antropogénicas perturbadas. Por ello su uso potencial no se basa únicamente como un cultivo comercial sino como un excelente restaurador de la tierra dentro de programas de reforestación, ayudando de ésta manera, en la protección de laderas erosionadas y en la restauración de bosques transformados por el hombre (Luteyn, 2002).

## **2.4. Cultivo *in vitro***

Cultivo *in vitro* o micropropagación es la técnica que ha logrado rápida aceptación en la industria y se está practicando tanto en especies hortícolas como en ornamentales y aun en leñosas. Esta metodología presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación, entre ellas (Abdelnour-Esquivel y Vincent, 1994):

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida a bajos costos y en un tiempo económicamente costeable.
- Mayor control sanitario del material que se propaga.
- Facilidad de transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existen pocos individuos.

### **2.4.1. Factores que intervienen en el cultivo de tejido**

#### **2.4.1.1. Explante**

Es el órgano, tejido o fragmento de tejido, células, etc. extraído del material parental para iniciar el cultivo *in vitro*. La elección del explante adecuado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, este variara de acuerdo al objetivo perseguido (Abdelnour-Esquivel y Vincent, 1994). Además, las plantas leñosas presentan varias dificultades frente

a plantas herbáceas. Muchas especies resultan ser recalcitrantes para el cultivo *in vitro*, y por lo general se ha visto que con tejidos juveniles se tiene mayor éxito en las diversas técnicas del cultivo de tejidos. Aparte de la edad del tejido, también influye el genotipo, el tipo de tejido y la estación o época del año en que se obtuvo el explante (Ahuja, 1992).

#### **2.4.1.2.pH**

El grado de acidez o alcalinidad del medio de cultivo es importante y específico para cada tipo de plantas, al igual que el suelo, por lo que se hace necesario ajustarlo a los requerimientos de la especie en estudio (Abdelnour-Esquivel y Vincent, 1994).

#### **2.4.1.3.Intercambio gaseoso**

Los gases más corrientes son O<sub>2</sub> (oxígeno), CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) y C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (etileno) (Abdelnour-Esquivel y Vincent, 1994).

#### **2.4.1.4.Humedad**

En condiciones *in vitro* la humedad dentro de los recipientes es casi 100 por ciento. Por eso la planta *in vitro* en general no desarrolla adecuados sistemas de regulación hídrica tales como cera, estomas, cutícula, etc. (Abdelnour-Esquivel y Vincent, 1994).

#### **2.4.1.5.Luz**

En condiciones *in vitro* clásicas, la intensidad y calidad de la luz es muy baja. Por ello, se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala para tener diferentes tipos de onda (Abdelnour-Esquivel y Vincent, 1994).

#### **2.4.1.6.Temperatura**

Es utilizado para conservación del cultivo, limitando el crecimiento de la plántula a baja temperatura (Fairlie *et al.*, 1999).

#### **2.4.1.7.Medio de cultivo**

Consiste de una mezcla de determinadas sustancias sobre o dentro del cual los explantes (inóculos). Para su uso, el medio de cultivo se esteriliza ya sea en autoclave o por filtración a través de filtros de papel miliporosos (Abdelnour-Esquivel y Vincent, 1994).

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y multiplicación de los cultivos. Básicamente, los medios de cultivo e componen de compuestos que suministran (Levitus *et al.*, 2010):

- **Fuente de carbono:** Prácticamente todos los cultivos son heterótrofos (comparativamente unos pocos son autótrofos) y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono. La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5 por ciento, es el azúcar más utilizado.
- **Nutrientes minerales:** Los medios de cultivo deben suministrar los mismos macro y micronutrientes que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras. En general se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. También se pueden utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado juntamente con un agente quelante ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), lo que lo hace disponible es un amplio rango de pH.
- **Sustancias vitamínicas:** De todas las que comúnmente se incorporan a los medios, pareciera que la tiamina es la única realmente imprescindible para el buen crecimiento de los cultivos.
- **Sustancias reguladoras del crecimiento:** En la mayoría de los casos los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen auxinas (ANA, 2,4-D, AIA, AIB, NOA, Dicamba, Picloram) y/o citoquininas (BA, KIN, ZEA, 2iP, Thidiazurón). Las giberelinas (especialmente GA3) son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemas o para la elongación de brotes. El ABA, es usado en algunos casos.
- **Agente gelificante** (en el caso de medios semisólidos): El agar (entre 0,6 y 1 por ciento) es el compuesto más utilizado.
- **Otros compuestos:** Muchas sustancias, de variada composición química, suelen ser adicionadas a los medios básicos. Además de la glicina, otros aminoácidos se pueden

agregar a los medios. El carbón activado (0,1 a 5 por ciento) suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos.

#### **2.4.2. Propagación de *Vaccinium floribundum* Kunth**

Siendo una especie silvestre, es muy poco lo que se ha investigado sobre formas de propagación; sin embargo, se han realizado trabajos de propagación con otras especies silvestres diferentes a *V. floribundum* los cuales sirven de referencia para el trabajo de investigación a desarrollar.

Los trabajos de micropropagación o propagación *in vitro* con arándano (*V. corymbosum*) consiste en la proliferación de una estaquilla, a partir del tejido extraído desde una yema axilar y cultivada en un medio nutritivo, compuesto por macro y microelementos; además de reguladores de crecimiento (Muñoz, 1988 y Buzeta, 1997)

El medio de cultivo que se usa comúnmente en la propagación de *Vaccinium* es el medio de Loyd y McCown (1980), conocido como Woody Plant Medium (WPM) o modificaciones de este. De los múltiples estudios llevados a cabo sobre propagación *in vitro* de diversas especies del género *Vaccinium* se ha visto que la eficiencia de la propagación es influenciada por el balance y tipo de reguladores de crecimiento y por el tipo de medio de cultivo que se utiliza, reportándose que las plantas producidas por el cultivo *in vitro* tienen un crecimiento vigoroso y superior en el campo frente a planta propagadas por métodos tradicionales (Debnath, 2006).

#### **2.4.3. Propagación de *Maclenia rupestris* Kunth A. C. Smith**

Las semillas constituyen un recurso indispensable para la conservación y propagación el germoplasma (Pallardy, 2008). Para el caso de semillas con eficiente grado de madurez, su germinación en condiciones de invernadero y laboratorio suele darse en corto tiempo, siendo el crecimiento de las plántulas muy lenta, especialmente cuando no existe asociación con micorrizas, alcanzando 12 cm en 12 meses de desarrollo vegetativo (Acero y Bernal, 2003).

Se han realizado investigaciones de propagación *in vitro* de *Maclenia rupestris*. Este proceso consiste en promover la germinación de las semillas en medios Murashige y Skoog (MS) y ½ Murashige y Skoog (MS) suplementados con agar, sucrosa y sin fitorreguladores logrando el 100 por ciento de germinación a la cuarta semana de siembra (Guzmán *et al.*, 2005).

Para ambas especies, el CIRGEBB inicio en el año 2015 trabajos de investigación tendientes a establecer medios de micropropagación llegando a la conclusión que el medio WP suplementado con citoquininas da resultados positivos. Esto es corroborado por Wolfe *et al.*, (1983) donde realizaron un trabajo en el cual probaron 7 medios de cultivo para arándano, llegando a la conclusión que el mejor medio de cultivo fue el “Woody Plant Medium” (WPM) descrito por Lloyd y McCown (1980) es muy útil para esta especie.

## **2.5. Citoquinina**

Las citoquininas forman un numeroso grupo de fitohormonas, en el que son reconocidas más de 30 entre formas activas e inactivas (Mok y Mok, 2001). Se trata de derivados de la base adenina que en su posición N6 muestra varias substituciones, no teniendo la adenina sola, efecto hormonal alguno. El reconocimiento que las citoquininas pudiesen corresponder a hormonas vegetales se inició con el descubrimiento de la kinetina en la época de los 50, siendo este un artefacto (alteración indeseada introducida en una muestra de tejido) producto de la degradación del ADN en espermátidas de arenque sometidas al autoclavado (temperatura y presión).

Su efecto hormonal fue visualizado rápidamente al inducirse, en compañía de auxina, diferentes tipos de morfogénesis en tejidos de tabaco y de otras especies bajo condiciones *in vitro*. Un alto nivel de citoquinina vs. auxina provocaba la formación de brotes en tejidos derivados de explantes de médula, mientras que con niveles bajos de citoquininas y/o conjuntamente niveles altos de auxina, se observaba la formación de masas celulares no organizadas (callos) y la formación de raíces con gradientes mayores de auxina (Skoog y Miller, 1965). Posteriormente se descubrió la existencia natural de citoquininas en diferentes especies (como también en procariontes) siendo la zeatina, inicialmente hallada en semillas de maíz (*Zea mays*) la más frecuente y abundante, junto a su ribósido (Letham, 1973). Junto a la zeatina se detectaron otros compuestos de acción semejante en el endosperma líquido de coco o “agua de coco” (Caplin y Steward, 1948).

Según su origen se pueden distinguir dos tipos de citoquininas: aquellas naturales generadas por las plantas; y artificiales, sintetizadas por el hombre. Todas las citoquininas naturales se generan a partir de DMAPP y 5'-AMP y su síntesis acontece principalmente en la raíz, aunque también en el meristemo apical y en semillas inmaduras (Kakimoto, 2003).



Las citoquininas se localizan en ambos sistemas conductores, floema y xilema y su presencia se considera como una posible señal vinculada con un déficit de nutrientes en el suelo (Squeo y Cardemil, 2006).

Es considerado el responsable de los procesos de división celular, entre los que se encuentran la formación y crecimiento de brotes axilares, la germinación de semillas, la maduración de cloroplastos, la diferenciación celular (Klee y Estelle, 1991) y también el control de varios procesos vegetales como el retardo de la senescencia y en la transducción de señales (Sakakibara, 2006). Su participación en el desarrollo floral también es importante, regulando este proceso en algunas especies (Chen, 1991).

### **2.5.1. Efectos fisiológicos**

#### ***2.5.1.1.Promueven la división celular***

La aplicación de citoquininas estimula la progresión del ciclo celular. En primer lugar, a nivel de la fase G1, citoquininas más otras hormonas (auxinas) inducen la acumulación de ciclinas y por tanto promueven un nuevo ciclo celular. Citoquininas también estimularían la entrada a la fase M, probablemente por activación de una fosfatasa (Smith y Atkins, 2002).

#### ***2.5.1.2.Provocan la iniciación de brotes, organogénesis y androgénesis***

Las citoquininas causan una dominancia apical reducida o anulada, con brotación y crecimiento de yemas axilares. Pueden iniciar brotes adventicios en porciones de las hojas, venas y pecíolos intactos (Howell *et al.*, 2003). Junto a auxinas, promueven la producción de tejidos no organizados denominados callos, de los cuales es también posible inducir la formación de brotes y/o raíces, como también de embriones somáticos conducentes a plantas. Gran parte de las respuestas de totipotencia celular, de morfogénesis *in vitro* y de regeneración de plantas, ocurre en presencia de niveles apropiados de citoquininas vs. auxinas (Coenen y Lomax, 1997).

#### ***2.5.1.3.Demoran o retrasan la senescencia***

Uno de los efectos de las citoquininas es retardar la senescencia de las hojas, provocando que las hojas permanezcan más tiempo verdes por mayor contenido de clorofila y funcionales. Las citoquininas permiten el desarrollo de cloroplastos (con formación de granas) en oscuridad, reemplazando parcialmente la demanda de luz. Una mayor

permanencia de clorofilas activas implica para la hoja y la planta la conservación de la síntesis de proteínas y consiguiente transcripción de varios genes. Esto se ha demostrado con la expresión de varias bandas de proteínas que no son visualizadas cuando el tejido envejece (Smith y Atkins, 2002).

#### ***2.5.1.4. Activan yemas laterales en dormancia***

La sobreproducción de citoquininas resulta en una dominancia apical fuertemente reducida y en plantas la generación de entrenudos más cortos (Smith y Atkins, 2002).

#### ***2.5.1.5. Intensifican la expresión de “demanda” en el transporte de savia elaborada a nivel del floema***

Algunos estudios han sugerido que niveles muy bajos de nitrógeno en el suelo ( $\text{NO}_3$  ó  $\text{NH}_4$ ) resulta en una reducción del nivel de citoquininas. Lo contrario, un incremento del N en el suelo provoca un aumento del nivel de citoquininas, lo que a su vez conlleva a una regulación positiva de genes que, involucrados en respuesta a esta hormona, como los genes ARR tipo A (A-ARRs) (Howell *et al.*, 2003).

### **2.5.2. Mecanismos de acción**

Las citoquininas son las hormonas vegetales de la cual existe menor información en cuanto a biosíntesis, metabolismo y transducción de señales. Sin embargo, recientemente se han descrito algunos mecanismos de acción. Las citoquininas se encuentran tanto en el apoplasto como en el simplasto, de manera que se asume la existencia de transportadores específicos a este nivel. Se ha demostrado que estas hormonas son primero percibidas por proteínas histidina-quinasa y que la transducción de la señal por ellas provoca una fosforilación en su porción conservada y con transferencia del grupo fosforilo a un regulador de respuesta más distante (Kakimoto, 2003).

## **III. METODOLOGÍA**

### **3.1. Materiales**

#### **3.1.1. Material vegetal**

Para el experimento se emplearon plántulas *in vitro* de *Vaccinium floribundum* Kunth y *Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith mantenidas en el Banco *in vitro* por el Centro de Investigación de Recursos Genéticos, Biotecnología y Bioseguridad (CIRGEBB) de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

#### **3.1.2. Medio de cultivo**

El medio de cultivo empleado fue el de Loyd y McCown (1980), conocido como Woody Plant (WP) (Anexo 1).

#### **3.1.3. Reguladores de crecimiento**

- Solución madre de zeatina 1000 ppm
- Solución madre de kinetina 1000 ppm

#### **3.1.4. Materiales del laboratorio**

- Algodón
- Pinza
- Bisturí
- Estilete
- Cinta de embalaje
- Parafilm™
- Pabilo
- Envase de vidrio de 500 ml
- Pipetas graduadas de 10ml, 5ml y 2 ml

- Placas Petri
- Probetas de 1000 ml, 100 ml y 50 ml
- Puntas de micropipeta de 10-200  $\mu\text{l}$  y 100-1000  $\mu\text{l}$
- Vasos de precipitado
- Mechero

### 3.1.5. Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Cámara fotográfica digital
- Congeladora de  $-20^{\circ}\text{C}$
- Desionizador de agua
- Horno de secado
- Horno microondas
- Potenciómetro
- Purificador de  $\text{H}_2\text{O}$
- Refrigeradora
- Ambiente Controlado de Crecimiento.
  - o Temperatura:  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
  - o Fotoperíodo: 8/16 hrs
  - o Luminosidad:  $47,74 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Preparación de medios de cultivos

Se preparó medios de cultivo que constituyeron los tratamientos a evaluar, siendo estos:

- **Medio CONTROL:** Componentes del medio Loyd y McCown (1980), suplementado con sacarosa al 2 por ciento y agar al 0.6 por ciento.  $\text{pH} = 5.6$
- **Medio CIRGEBB:** Componentes del medio Loyd y McCown (1980), suplementado con zeatina al 0.5 ppm, sacarosa al 2 por ciento y agar al 0.6 por ciento.  $\text{pH} = 5.6$

- **Medio A:** Componentes del medio Loyd y McCown (1980), suplementado con kinetina al 0.5 ppm, sacarosa al 2 por ciento y agar al 0.6 por ciento. pH = 5.6
- **Medio B:** Componentes del medio Loyd y McCown (1980), suplementado con kinetina al 1.0 ppm, sacarosa al 2 por ciento y agar al 0.6 por ciento. pH = 5.6

### **3.2.2. Homogenización**

Las plántulas de las cuales se obtuvieron los microesquejes para el desarrollo de los experimentos fueron cultivadas durante 60 días en medio Loyd y McCown (1980), en condiciones controladas de temperatura, fotoperiodo y luminosidad; a esto se denomina la fase de homogenización fisiológica de las plantas donadoras de esquejes.

### **3.2.3. Instalación de los experimentos**

#### ***3.2.3.1. Propagación del material acondicionado***

- Se utilizaron plantas *in vitro* homogenizadas como fuente de explantes.
- En condiciones estériles se extrajeron las plántulas y en una placa Petri estéril fueron seccionadas dentro de la cámara de flujo laminar, los instrumentos fueron previamente esterilizados.
- Se colocaron cinco microesquejes de aproximadamente 1 centímetro de longitud para cada unidad experimental (frasco).
- Se cerraron el frasco con papel aluminio y parafilm.

#### ***3.2.3.2. Incubación del explante***

Una vez realizado la siembra de todos los explantes en sus respectivas unidades experimentales, éstas se llevaron al área de cultivo, el cual se encuentra en condiciones óptimas para su desarrollo. Está equipado con una fuente de luz de  $47,74 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de intensidad, con temperatura  $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  con un fotoperiodo de 8 horas de luz/ 16 horas de oscuridad controlado por un reloj programador.

#### ***3.2.3.3. Descripción de los tratamientos***

Para el presente trabajo los tratamientos fueron los cuatro tipos de medio de cultivo con cinco repeticiones por cada especie, según como sigue:

- T1: Medio CONTROL
- T2: Medio CIRGEBB
- T3: Medio A
- T4: Medio B

### 3.2.4. Descripción de la unidad experimental

Para el presente trabajo se utilizó como unidad experimental un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad conteniendo 25 ml de medio de cultivo con la hormona seleccionada y con cinco explantes por unidad experimental.

### 3.2.5. Análisis estadísticos

Se realizó un diseño experimental al azar (DCA) con cuatro tratamientos y siete repeticiones por cada especie. La unidad experimental consistió de cinco microesquejes en un frasco con medio de cultivo.

$$x_{ij} = \mu + t_i + \varepsilon_i$$

Donde:

$x_{ij}$  = es una observación cualquiera dentro del experimento

$\mu$  = es la media poblacional

$t_i$  = es el efecto de j-ésimo bloque o repetición

$\varepsilon_i$  = es el error experimental

$i = 1, 2, 3, \dots, t =$  tratamiento

$j = 1, 2, 3, \dots, r =$  repetición

### 3.2.6. Variables respuesta

Las variables respuestas son longitud del explante, número de hojas, número de brotes y número de raíces. Además, se realizó un análisis cualitativo. Para el presente trabajo la frecuencia de evaluación fue de cada 60 días; acumulando un total de dos evaluaciones.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A los 60 días de sembrados los microesquejes fue difícil observar las diferencias en cuanto al desarrollo de los explantes, sin embargo, es posible esbozar algunas tendencias. Los microesquejes sembrados en el medio WP resultaron con aspecto delgado, en el medio suplementado con zeatina se observó una mayor proliferación de brotes, pero estos eran delgados. En el medio suplementado con kinetina se observó un buen desarrollo en las diferentes concentraciones estudiadas y en ambas especies, como se observa en la Tabla 3 (Anexo 2).

**Tabla 3:** Promedio de los resultados de las variables a los 60 días de la siembra

Especie	Tratamientos	Longitud del explante	Número de brotes	Número de hojas	Número de raíces
“pushgay”	Control (WP)	1.48 b	3.17 b	19.51 b	0.00 b
	ZEA 0.5	1.18 b	5.66 a	42.23 a	0.00 b
	KIN 0.5	1.83 a	1.91 c	20.34 b	0.00 b
	KIN 1.0	1.99 a	2.77 bc	20.34 b	0.80 a
“alicon”	Control (WP)	1.22 a	1.00 c	2.63 b	2.63 a
	ZEA 0.5	1.40 a	2.46 a	9.31 a	0.00 b
	KIN 0.5	1.49 a	1.26 bc	3.69 b	3.80 a
	KIN 1.0	1.34 a	1.49 b	3.40 b	3.26 a

A diferencia de los resultados anteriores, a los 120 días se obtuvo promedios más diferenciados y desarrollo de los explantes más evidentes, según el Tabla 4.

Es por ello que, en la composición de los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento juegan un rol de primer orden, los cuales dependen de la especie vegetal y de la etapa de micropropagación (Castillo, 2004). Con el objetivo de interrumpir la dominancia apical y así promover la inducción y proliferación de yemas axilares *in vitro*, se recurre al uso

de citoquininas, siendo importante determinar las concentraciones más adecuadas y el tipo de citoquinina que debe usarse en cada caso (Ostrolucká *et al.*, 2004; Erig y Schuch, 2006).

**Tabla 4:** Promedio de los resultados de las variables a los 120 días de la siembra

<b>Especie</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Longitud del explante</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Número de hojas</b>	<b>Número de raíces</b>
<b>“pushgay”</b>	Control (WP)	2.06 b	3.86 b	30.83 b	1.23 ab
	ZEA 0.5	1.67 b	10.91 a	107.66 a	0.00 b
	KIN 0.5	2.59 ab	2.23 c	28.74 b	0.71 ab
	KIN 1.0	3.53 a	3.66 bc	35.17 b	1.91 a
<b>“alicon”</b>	Control (WP)	2.26 a	1.00 b	4.83 b	4.03 a
	ZEA 0.5	2.27 a	3.17 a	15.86 a	0.00 b
	KIN 0.5	2.75 a	1.29 b	6.34 b	5.11 a
	KIN 1.0	2.68 a	1.51 b	5.46 b	4.11 a

Se ha generalizado en los trabajos *in vitro* el uso de zeatina y kinetina. Sin embargo, el alto costo de la zeatina la excluye de un uso extensivo como hormona de crecimiento, aunque a pequeña escala su uso está recomendado por ejemplo para iniciar el crecimiento de explantes (Reed y Abdelnour-Esquivel, 1991). En el caso que el costo sea un problema se deben buscar alternativas que reemplacen su uso, es el caso del presente estudio.

#### **4.1. Longitud del explante**

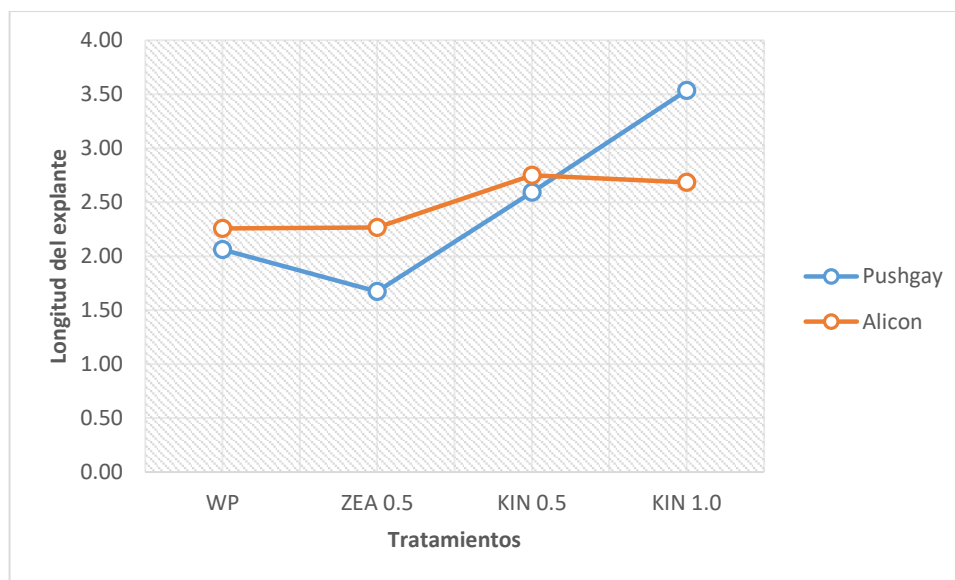
El valor promedio de la longitud de los explantes a los 60 y 120 días después de la siembra en “pushgay” y “alicon” se muestra en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

A los 120 días de sembrado el explante, en “pushgay” se observó mayor crecimiento en el medio suplementado con kinetina 1.0 ppm seguido del medio suplementado con kinetina 0.5. En “alicon”, se puede observar un mayor crecimiento en el medio suplementado con kinetina 0.5 ppm seguido del medio con kinetina 1.0 ppm. De esta manera se logró esbozar algunas tendencias del desarrollo *in vitro* para ambas especies.

Al realizar el análisis de varianza para la variable longitud del explante a los 120 días de sembrados los explantes, muestra que existen diferencias significativas de los diferentes tratamientos tanto para “pushgay” como “alicon”, como puede observarse en el Anexo 5.



La comparación de la longitud del explante entre las diferentes especies y tratamientos se utilizó la prueba de Tukey al 95 por ciento de confianza a los resultados obtenidos (Anexo 5) como indica la Figura 1.



**Figura 1:** Efecto de la interacción entre especie y tratamiento para la longitud del explante a los 120 días de la siembra

En la composición de los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento juegan un rol de primer orden, los cuales dependen de la especie vegetal y de la etapa de micropropagación (Castillo, 2004). Para Reynolds, Wardle, Zurowsky y Looney (1992), las citoquininas al ser aplicadas en forma exógena a las plantas, pueden estimular una serie de procesos fisiológicos, metabólicos, bioquímicos y de desarrollo. La principal respuesta corresponde a la promoción de la división y elongación celular a través de un incremento de la plasticidad de las paredes celulares.

Otra respuesta de los vegetales es el retraso de la senescencia de los tejidos, lo cual tiene como causa aparente la mantención de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos en las zonas aplicadas. También estimula el movimiento de los nutrientes (Dokoozlian, 2001).

De los resultados, se puede observar una notoria diferencia entre las dos citoquininas empleadas. La respuesta de zeatina se refleja en menor longitud del explante y mayor proliferación de brotes adventicios para ambas especies. Esto lo describe Debnath (2003) indicando que en ensayos con zeatina obtuvo un incremento en el número de yemas adventicias, pero sin elongación; concluyendo que las citoquininas comúnmente estimulan la proliferación de brotes e inhiben su elongación.

La respuesta al uso de kinetina, se expresa en mayor longitud del explante y menor proliferación de brotes, lo que ha sido también descrito por Rodríguez y Morales (2015) al trabajar con *Vaccinium corymbosum* L, detallando que las plántulas se caracterizaron por ser altas, pero con baja proliferación de brotes por explante.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observan que las diferencias encontradas en los promedios de longitud de las especies son debidas a sus características genéticas y la influencia de las citoquininas presentes en el medio. Y que existió una mejor respuesta en el medio suplementado con kinetina.

#### **4.2. Número de Brotes**

Según Gómez (2002), indica que la formación de brotes es una de las etapas fundamentales en la micropropagación ya que no solamente permite obtener un alto número de clones homogéneos, sino que es una de las formas de bajar los costos de producción, al momento de inducir a una vitroplanta que forme dos brotes, el costo de producción individual se reduce a la mitad.

Por lo tanto, la tasa de multiplicación de brotes se puede optimizar sustancialmente con la adición en el medio nutritivo de concentraciones apropiadas de citoquininas con o sin una auxina (Bhojwani y Razdan, 1996).

Para el presente trabajo de investigación se utilizó como medio basal al medio WP, adicionando dos citoquininas; kinetina y zeatina; a diferentes concentraciones. Hurtado y Merino (1997) indican que el éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también el empleo de tejidos viables y la calidad de reactivos, usando las sustancias químicas necesarias y combinaciones apropiadas de nutrientes.

Al igual que la variable anterior, se realizaron evaluaciones a los 60 y 120 días de la siembra para ambas especies, “pushgay” y “alicon”, como se muestra en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

Al realizar el análisis de varianza para la variable de número de brotes a los 120 días de sembrados los explantes, reporto que existen diferencias significativas de los diferentes tratamientos tanto para “pushgay” como “alicon”, como se observa en el Anexo 5.

Para la comparación del número de brotes entre las diferentes especies y tratamientos se utilizó la prueba de Tukey al 95 por ciento de confianza a los resultados obtenidos (Anexo 5) como indica la Figura 2. En “pushgay” se observó el mayor número de brotes en el medio suplementado con zeatina 0.5 ppm seguido del medio control, medio suplementado con kinetina 1.0 ppm y medio suplementado con kinetina 0.5 ppm. Si bien es cierto estadísticamente se demostró que no existen diferencias significativas entre el medio control y el medio suplementado con kinetina 1.0 ppm, la diferencia se encuentra en la vigorosidad de los brotes presentes en el medio suplementado con kinetina 1.0 ppm (Figura 4D).

En “alicon”, el medio suplementado con zeatina 0.5 ppm presenta el mayor número de brotes seguido del medio suplementado con kinetina 1.0 ppm, medio suplementado con kinetina 0.5 ppm y medio control. A diferencia de “pushgay”, en “alicon” los explantes del medio con kinetina 0.5 ppm mostraron mayor tamaño y vigor (Figura 5C). Lo cual se logra esbozar la tendencia del desarrollo *in vitro* de esta variable para ambas especies.



**Figura 2:** Efecto de la interacción entre especie y tratamiento para el número de brotes a los 120 días de la siembra

Como se observó, cada especie responde diferentes a los medios por lo que hay que analizar cuál es el que permiten su mejor desarrollo, esta diferencia se debe principalmente según Poma (2014) al comportamiento propio de cada especie, el cual se encuentra determinada por sus características genéticas y su respuesta a las condiciones del medio en el que se desarrollan.

Otra diferencia se atribuye a las diferentes citoquininas y las diferentes concentraciones lo que afectan e inciden en la formación de brotes, sumado la relación auxina/citoquinina, sin olvidar el comportamiento propio de la especie, determinada por sus características genéticas y su respuesta a las condiciones del medio en el que se desarrollan.

Existen dos tipos de citoquininas, las naturales como zeatina y las sintéticas como kinetina. Las citoquininas naturales son rápidamente degradadas por la citoquinina oxidasa de las plantas, reduciendo así su actividad en los cultivos *in vitro*. Por lo que, las citoquininas naturales promueven la brotación de forma rápida. Por otro lado, una ventaja de las citoquininas sintéticas es que son más baratas y accesibles para las explotaciones comerciales, además de tener un efecto prolongado (George, 1993).

Es común que los explantes respondan a la aplicación de reguladores de crecimiento exógenos, con incremento de volumen de tallos y una reducción del tamaño de las hojas, debido a que se desconoce la concentración hormonal endógena, y una aplicación exógena de reguladores de crecimiento, trae como consecuencia anomalías en la arquitectura de los brotes (Osuna-Ávila y Saucedo, 2011). Por ello, la relación auxina/citoquinina es muy importante, ya que esta permite regular la organogénesis o a desdiferenciación. Según Krikorian (1995) cuando la relación de auxina/citoquinina es baja se producen vástagos; esto quiere decir que debe existir una baja concentración de auxinas y una alta concentración de citoquininas. Por tal motivo, al medio de cultivo no se agregó auxina, de esta manera se reducen costos y el tiempo para producir plantas.

También se ha reportado que una mayor densidad de explantes en el frasco produce una mayor acumulación del gas etileno reduciendo la disponibilidad de oxígeno para la respiración de las plantas, inhibiendo la brotación (Zobayed *et al.*, 2001; Hazarika, 2006). Por otra parte, Williams (1995) sostuvo que los tejidos vegetales (explantes) pueden contribuir a cambios en el medio de cultivo, ya sea por absorción de sustancias desde el medio o exudación al medio, alterando el pH de éste, favoreciendo o inhibiendo el desarrollo de las plantas, debido a que difunden compuestos secundarios en el medio de cultivo a partir de los explantes, que reducen el número de brotes, provocándose el agotamiento y competencia por nutrientes (Aicha *et al.*, 2014). A esto se le añade que las altas densidades de explantes provocan un aumento de la humedad relativa al interior del frasco, lo que disminuye la brotación.

Como se observa en la Figura 2, las especies, “pushgay” y “alicon”, mostraron mayor número de brotes en el medio suplementado con Zeatina 0.5 ppm. Sin embargo, se obtuvieron explantes no aptos para multiplicación, ya que emitieron muchos brotes, pero de tamaño muy pequeños y muy unidos entre sí, lo cual dificultó el conteo de estos; siendo *Vaccinium floribundum* Kunth, la especie que presentó mayor dificultad.

Una respuesta similar de los explantes *Limonium* “Misty blue” ha sido observada por Chamorro *et al.* (2007) quienes dieron que a medida que aumenta la concentración de KIN (0.5, 1.0 y 2.0 mg/L) la tasa de multiplicación se incrementa, pero el vigor de los brotes disminuye, es decir, el tratamiento con la concentración más baja de kinetina muestra mejor calidad en su forma y tamaño de hoja. Pero difiere de la capacidad de regeneración del explante para la formación de nuevas células, que viene determinado por el genotipo y el estado de desarrollo de la planta tal como afirma Pierik (1990).

### **4.3. Número de hojas**

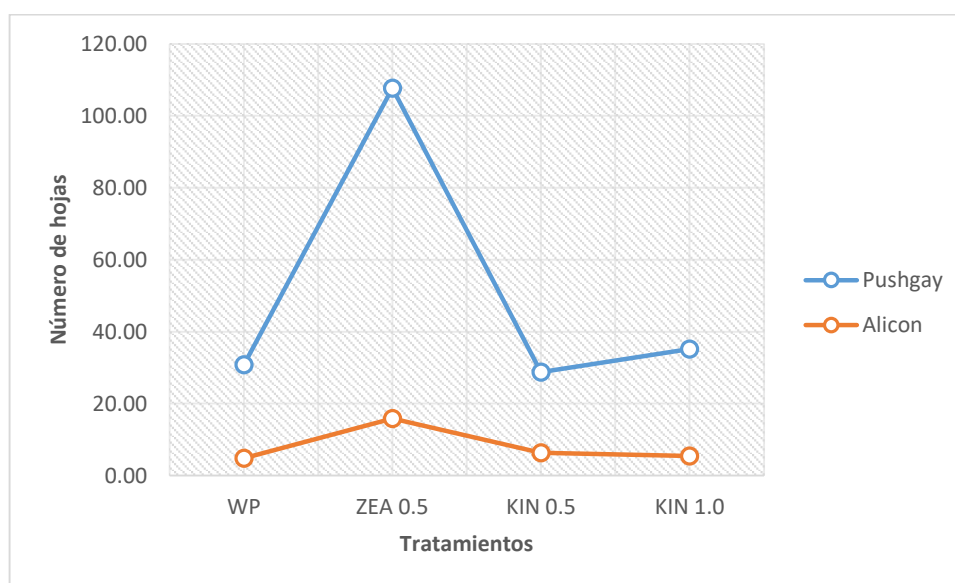
De la misma manera que las otras variables, las evaluaciones se realizaron a los 60 y 120 días después de la siembra en “pushgay” y “alicon” como se muestra en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

Al realizar el análisis de varianza para la variable de número de brotes a los 120 días de sembrados los explantes, reporto que existen diferencias significativas de los diferentes tratamientos tanto para “pushgay” como “alicon”, como se observa en el Anexo 5.

Para la comparación del número de hojas entre las diferentes especies y tratamientos se utilizó la prueba de Tukey al 95 por ciento de confianza a los resultados obtenidos (Anexo 5). En “pushgay” se obtuvo el mayor número de hojas en el medio suplementado con zeatina 0.5ppm seguido por el medio suplementado con kinetina 1.0 ppm, el medio control y el medio suplementado con kinetina 0.5 ppm. Además, las hojas tenían un color verde de aspecto saludable y de gran tamaño en el medio suplementado con kinetina 1.0 ppm (Figura 4D). Mientras, el medio control y el medio suplementado con zeatina 0.5 ppm presentaron verde amarillento y granate (Figura 4A y 4B, respectivamente), el medio suplementado con kinetina 0.5 ppm presenta coloración verde y granate (Figura 4C).

Por el contrario, en “alicon” el efecto es diferente, existen dos grupos. El tratamiento con mayor número de hojas es el medio suplementado con zeatina 0.5ppm seguido por el medio

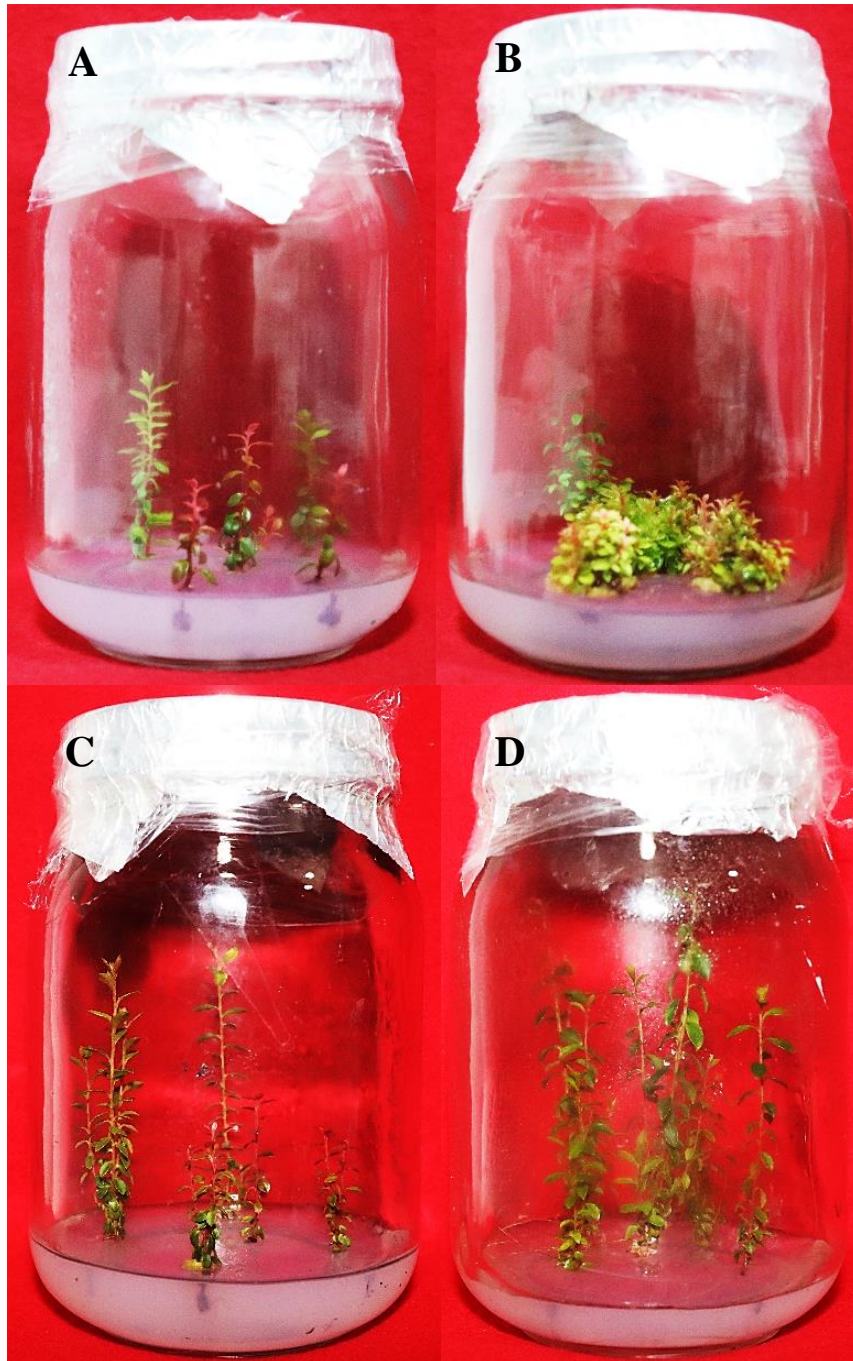
suplementado por kinetina 0.5 ppm, el medio suplementado con kinetina 1.0 ppm y el medio control como indica el Anexo 6.2. A diferencia de “pushgay”, en “alicon” el medio suplementado con kinetina 0.5 ppm presenta hojas de color verde de saludable aspecto (Figura 5C). Mientras que el medio control presento hojas de color verde oscuro y tallos delgados (Figura 5A), el medio suplementado con zeatina 0.5 ppm hojas color verde amarillento y rosados (Figura 5B), y el medio suplementado con kinetina 1.0 ppm presento hojas verdes y verde amarillento (Figura 5D).



**Figura 3:** Efecto de la interacción entre especie y tratamiento para el número de hojas a los 120 días de la siembra

La Figura 3, mostro el efecto de los tratamientos en las especies para el número de hojas, lo cual se encuentra relacionada con la proliferación de brotes por explante. Tanto “pushgay” como “alicon” presentaron un mayor número de hojas en el medio suplementado con zeatina 0.5 ppm, estas hojas presentaron coloración amarillenta (hojas viejas) y rojiza o granate (hojas nuevas) como se muestra en la Figura 4B y 6B. Resultados similares obtuvieron Troncoso y otros (1997), estos hacen referencia que al existir una gran cantidad de hojas en un espacio pequeño se va a producir una competencia por espacio y nutrientes, lo que ocasiona que algunas hojas no dispongan de un mayor cantidad de clorofila y por ende pierdan su color verde. Según Arjona (2001), cuando las hojas son jóvenes presentan una coloración granate o rosadas y posteriormente cambian a verde.

Como se observó el uso de zeatina promueve una rápida proliferación de brotes, por consiguiente, la formación de hojas es mayor, lo cual dificultó el conteo y solamente se hizo un aproximado del número de hojas. Por tal motivo, no se recomienda el número de hojas como variable. Mientras que el uso de kinetina no influyó sobre la formación de hojas, es decir, los explantes en donde se adicionó esta hormona tuvieron hojas estadísticamente similares a los del medio control en el número de hojas; sin embargo, estas fueron más grandes y de coloración saludable.



**Figura 4:** Desarrollo de “pushgay” (*Vaccinium floribundum* Kunth) en medio de cultivo con diferentes reguladores de crecimiento A: medio control, B: zeatina 0.5ppm, C: kinetina 0.5ppm, D: kinetina 1.0ppm.





**Figura 5:** Desarrollo de “alicon” (*Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith) en medio de cultivo con diferentes reguladores de crecimiento A: medio control, B: zeatina 0.5ppm, C: kinetina 0.5ppm, D: kinetina 1.0ppm.

Otra causa del crecimiento reducido, desarrollo radicular restringido y hojas amarillentas es provocada por la deficiencia de nitrógeno según Cadavid (2000). Además, Barwale *et al.* (1986) señala que las deficiencias de nitrógeno originan bajo brotes por explante con tallos finos y cortos con hojas pequeñas. Esto se debe a que el nitrógeno favorece el crecimiento vegetativo, imparte el color verde a las hojas y regula fosforo y potasio de deficiencia (Cadavid, 2000).

#### **4.4. Número de raíces**

Al igual que las otras variables, las evaluaciones se realizaron a los 60 y 120 días después de la siembra en “pushgay” y “alicon” como se muestra en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

Al realizar el análisis de varianza para la variable de número de raíces a los 120 días de sembrados los explantes, reporto que existen diferencias significativas de los diferentes tratamientos tanto para “pushgay” como “alicon”, como se observa en el Anexo 5.

Para la comparación del número de hojas entre las diferentes especies y tratamientos se utilizó la prueba de Tukey al 95 por ciento de confianza a los resultados obtenidos (Anexo 5) como se observa en la Figura 5. En “pushgay”, se registró el crecimiento de raíces adventicias en el tratamiento suplementado con kinetina 1.0ppm (Figura 7D) seguido por el medio control (Figura 7A) y el medio suplementado con kinetina 0.5 ppm (Figura 7C). En el medio suplementado con zeatina 0.5 ppm tuvieron formación de un callo verde rojizo en la base como muestra la Figura 7B.

Mientras que en “alicon”, resulto tener mayor número de raíces promedio el tratamiento suplementado con kinetina 0.5ppm (Figura 8C) seguido por en el tratamiento suplementado con kinetina 1.0ppm (Figura 8D) y finalmente el medio control (Figura 8A). En el medio suplementado con zeatina 0.5 ppm se formó callo de color café en la base de las plántulas como muestra la Figura 8B.



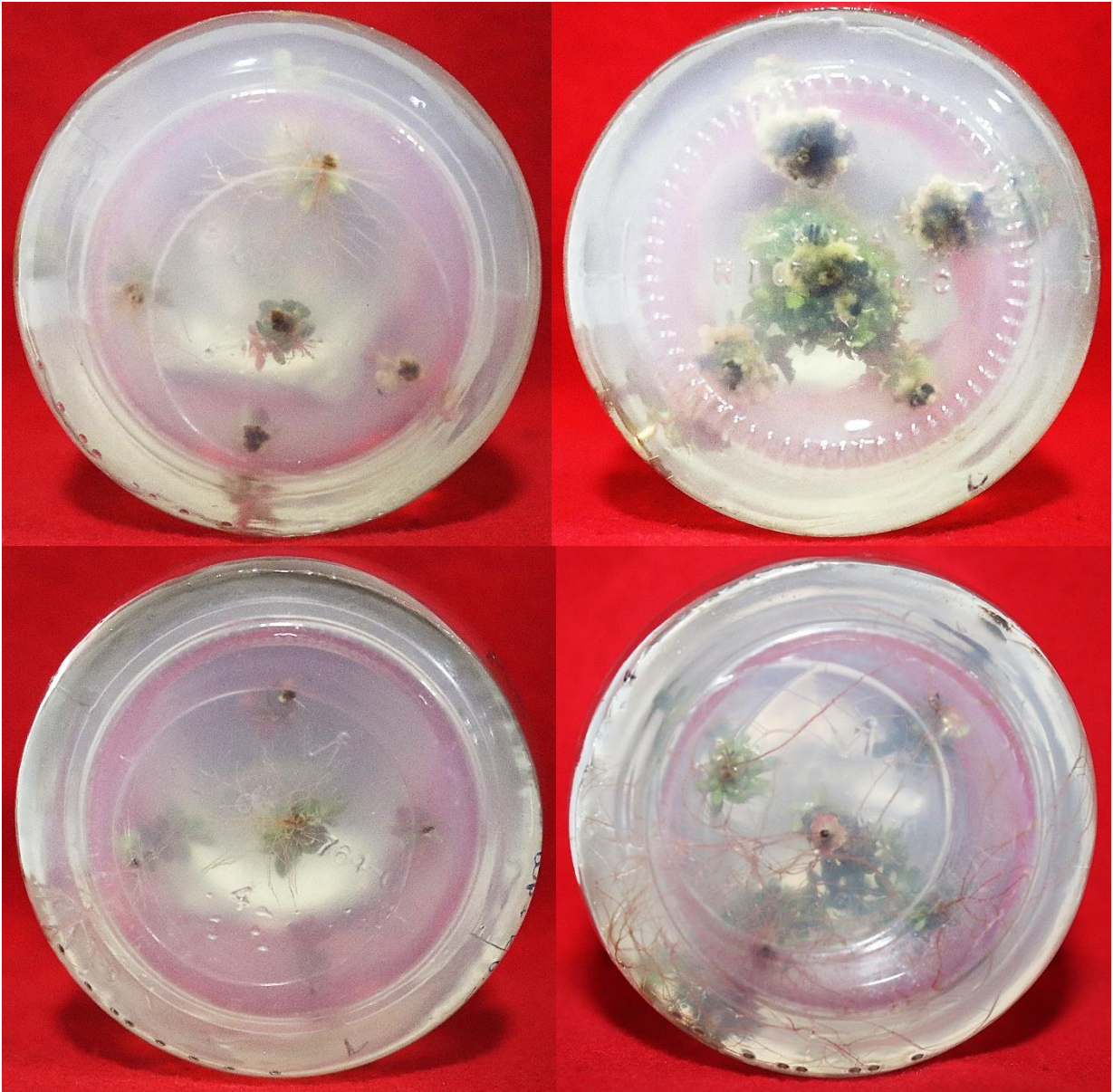
**Figura 6:** Efecto de la interacción entre especie y tratamiento para el número de raíces a los 120 días de la siembra

Como se sabe la formación de raíces depende de una relación óptima entre concentraciones totales de citoquininas y de auxinas exógenas y endógenas. Al respecto Krikorian (1995) señala que la relación auxina/citocinina es muy importante para el desarrollo de las plantas, cuando existe un es alta concentración de auxinas y baja concentración de citoquininas se forman raíces, cuando existe una baja concentración de auxinas y alta concentración de citoquininas se producen vástagos y cuando las concentraciones son similares o cercanas a 1 se producen callos.

En otras investigaciones la producción de callo se debe a altas concentraciones de auxina o citoquininas y que su aspecto está relacionado al tipo de hormona utilizada durante su inducción (Shiram *et al.*, 2008).

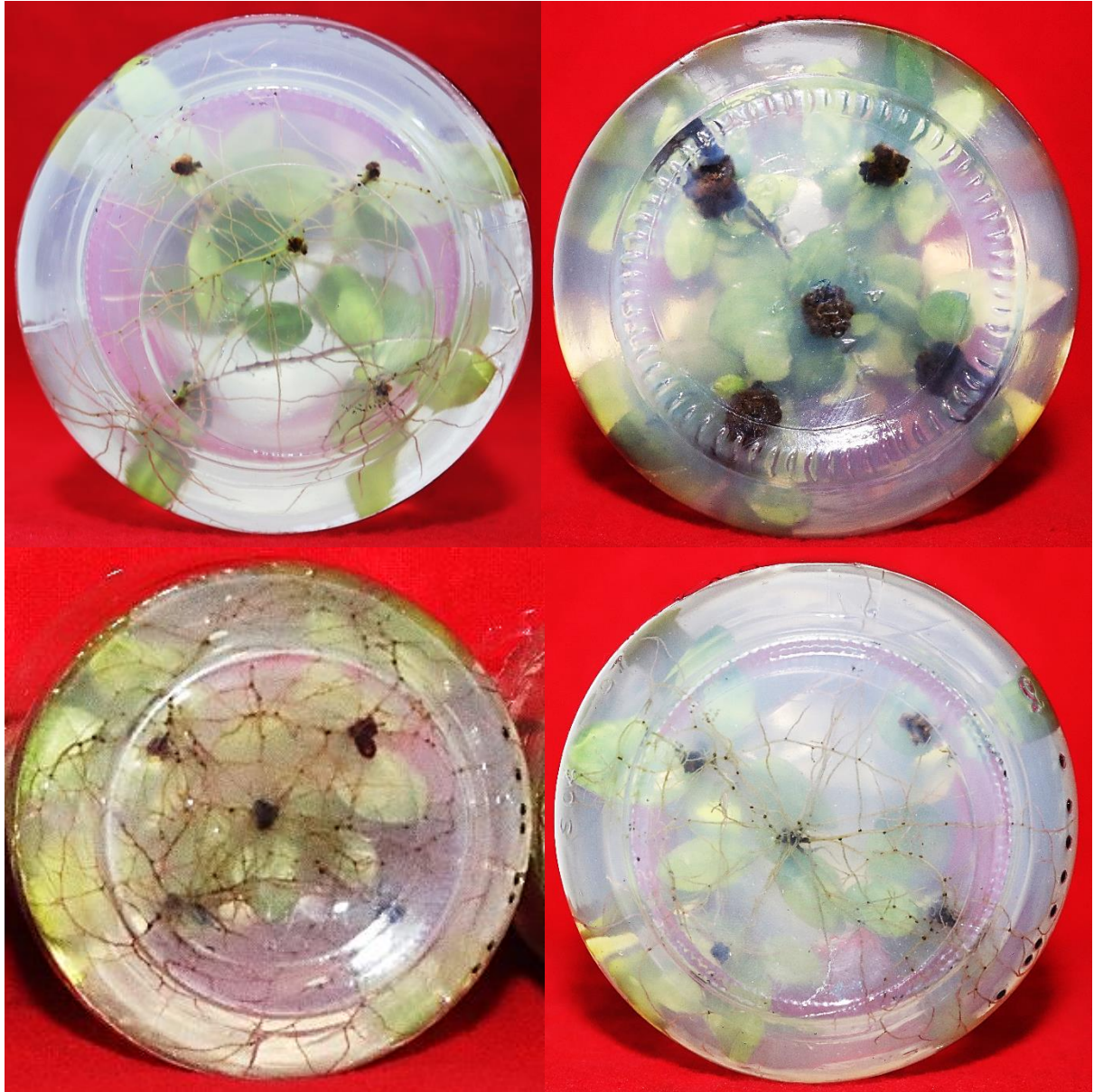
Si bien es cierto, la práctica de enraizamiento de los brotes propagados *in vitro* reviste gran importancia debido a que tiene como objetivo producir plantas con buenas características fisiológicas y morfológicas que puedan sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo. La formación del sistema radical y el crecimiento de las raíces son fundamentales para lograr la transferencia de las vitroplantas a condiciones de invernadero (Ruscitti *et al.*, 2000 citado por Quintero *et al.*, 2003). Sin embargo, según Quezada, Ascarrunz y Silva (2000) el número elevado de raíces aumenta el riesgo de contaminación al momento del repique, motivo por el cual inducir al enraizamiento es un proceso innecesario y contraproducente solo para esta etapa de multiplicación.





**Figura 7:** Crecimiento de raíces de “pushgay” (*Vaccinium floribundum* Kunth) en medio de cultivo con diferentes reguladores de crecimiento A: medio control, B: zeatina 0.5ppm, C: kinetina 0.5ppm, D: kinetina 1.0ppm.





**Figura 8:** Crecimiento de raíces de “alicon” (*Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith) en medio de cultivo con diferentes reguladores de crecimiento A: medio control, B: zeatina 0.5ppm, C: kinetina 0.5ppm, D: kinetina 1.0ppm.

## V. CONCLUSIONES

El presente trabajo demostró que el uso de kinetina es una alternativa eficaz para la micropropagación de las especies, *Vaccinium floribundum* Kunth y *Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith, ya que no solo se producen buen número de plántulas saludables, sino que su uso es mucho más económico que si se utiliza la zeatina.

Cada especie responde en forma diferente a cada una de las citoquininas empleadas en sus diferentes concentraciones. En relación al uso de la kinetina, *Vaccinium floribundum* Kunth mostro mejor desarrollo en el medio suplementado con kinetina 1.0 ppm mientras que *Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith expreso mejor respuesta en el medio suplementado con kinetina 0.5 ppm.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Vista la experiencia de una clara influencia genotipo-dependiente, se recomienda estudiar el efecto del fitorregulador kinetina en la propagación de otros berries nativos.
- Las plántulas que se utilicen para la micropropagacion deben tener un mínimo de dos centímetros de altura.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour-Esquivel, A., y Vincent, J. (1994). *Concepto básico del cultivo de tejidos vegetales*. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Recuperado de [http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/888/Conceptos\\_basicos\\_del\\_cultivo\\_de\\_tejidos\\_vegetales.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/888/Conceptos_basicos_del_cultivo_de_tejidos_vegetales.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Abril, D. (2010). *Las Ericaceas con Frutos Comestibles del Altiplano Cundiboyacense* (tesis de pregrado). Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8516>
- Acero, L. E., y Bernal, H. Y. (2003). *Guía para el cultivo, aprovechamiento y conservación de la uva camarona: Macleania rupestris (HBK)*. Bogotá, Colombia: Convenio Andrés Bello y Área de Ciencia y Tecnología.
- Ahuja, R. (1993). *Micropropagation of Woody Plants*. Dordrecht, Netherlands: Academic Publishers. doi: 10.1007/978-94-015-8116-5.
- Aicha, N., Mohamed, H., y Abdelmalek, E. (2014). *In vitro* clonal propagation through direct shoot organogenesis of *Thymus broussonetii* – a vulnerable aromatic and medicinal plant species. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Sciences*, 3(1), 425-439. Recuperado de <http://www.ijprbs.com/issuedocs/2014/2/IJPRBS%20583.pdf>
- Arjona, BB. (2001). El Mortiño o Agraz (*Vaccinium meridionale*, Ericaceae): como planta promisoría en la región del Parque Arvíl (Antioquia, Colombia). En *Seminario de Plantas Promisorias*. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- ASPADERUC (Asociación para el Desarrollo Rural de Cajamarca) (1997). *Biblioteca campesina: Plantas medicinales cajamarquinas, Recuperando nuestra medicina*



*tradicional campesina y la biodiversidad andina*. Cajamarca, Perú: Fredy's publicaciones y servicios E.I.R.L.

- Barwale, U., Kerns, H. R., y Widholm, J. M. (1986). Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogénesis. *Planta*, 167, 473-481. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/BF00391223>
- Bernal, H. Y., García, M. H., y Quevedo, S. F. (2011). Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia. Recuperado de <http://www.terrabrasil.org.br/ecotecadigital/pdf/pautas-para-el-conocimiento-conservacion-y-uso-sostenible-de-las-plantas-medicinales-nativas-en-colombia.pdf>
- Bhojwani, S., y Razdan, M. (1996). *Plant tissue culture: Theory and practice, a revised edition*. Ámsterdam: Elsevier Science. Recuperado de <https://epdf.pub/queue/plant-tissue-culture-theory-and-practice-studies-in-plant-science.html>
- Boni, S. (2016). *Evaluación de un sustrato orgánico para el enraizamiento de las estacas de joyapa (Macleania rupestris)* (tesis de pregrado). Universidad de Cuenca: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25840/1/tesis.pdf.pdf>
- Buzeta, A. (1997). *Chile: Berries para el 2000*. Departamento Agroindustrial. Santiago, Chile: Fundación Chile.
- Cadavid, L. F. (2000). Nutrición del cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). En *Curso de capacitación en sistema de producción de yuca*. Consorcio Latinoamericano y del Caribe de Apoyo a la Investigación y Desarrollo de la Yuca (CLAYUCA), Palmira, Colombia.
- Calderón, E. (1993). *Fruticultura General, el esfuerzo del hombre*. Mexico: Lamusa.
- Caplin, S. M., y Steward, F. C. (1948). Effect of coconut milk on the growth of the explants from carrot root. *Science*, 108, 655-657. doi: 10.1126/science.108.2815.655
- Cardozo, R., Córdoba, S., González, J., Guzmán, J., Lancheros, H., Mesa, L., Pacheco, R., Pérez, B., Ramos, F., Torres, M., y Zúñiga, P. (2009). *Especies Útiles en la Región*

*Andina de Colombia*. Tomo I. Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis, Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://docplayer.es/54663011-Especies-utiles-en-la-region-andina-de-colombia-tomo-i.html>

Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Recuperado de [http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad\\_382.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf).

Cerón, C. (1993). *Manual de Botánica Ecuatoriana Sistemática y Métodos de Estudio*. Quito, Ecuador: Universidad Central de Ecuador.

Chamorro, A., Martínez, S., Fernández, C., y Mosquera, T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Limonium* var. *Misty blue*. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 47-53. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/14396>

Chen, W. S. (1991). Changes in cytokinins before and during early flower bud differentiation in Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *Plant Physiol*, 96(4), 1203-1206. doi: 10.1104/pp.96.4.1203

Coenen, C., y Lomax, T. I. (1997). Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends Plant Science*, 2(9), 351-356. doi: 10.1016/S1360-1385(97)84623-7

Coria, L., Maihua, R., Peralta, F., Tereschuk, M., González, M., y Albarracín, P. (2008). Análisis de antocianinas en arándanos del NOA (*Vaccinium corymbosum* L.). Universidad Nacional de Tucumán. Departamento de Ingeniería de Procesos y Gestión Industrial. Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología. Argentina. Recuperado de <http://fcai.uncuyo.edu.ar/upload/04atc-coria-munoz-utn.pdf>

Corzo, D. C., y Torres, M. E. (2011). *Técnicas de aprovechamiento de especies vegetales presentes en las Áreas rurales del Distrito Capital*. Subdirección Científica. Bogotá D. C., Colombia: Jardín Botánico José Celestino Mutis.

- Dávila, D. (2001). Reseña de "Las Ericáceas en la Web: Neotropical Blueberries; The Plant Family Ericaceae" de Dr. James L. Luteyn. *Colombia*, 2(3), 291-293. Recuperado de <http://revistas.humboldt.org.co/index.php/biota/article/view/106>
- De Lozano, N. B., y De Valencia, M. L. (1992). Anatomía Floral De *Macleania rupestris* (H.B.K.) A.C. Smith (Uva Camarona). *Agronomía Colombiana*, 9(1), 85 – 101. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21142>
- De Valencia, M. L., y De Carrillo, N. M. (1991). Anatomía Del Fruto De *Macleania rupestris* (H.B.K.) A.C. Smith (Uva Camarona). *Agronomía Colombiana*, 8(2), 286-305. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21026/21964>
- Debnath, S. (2003). Improved shoot organogenesis from hypocotyl segments of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology–Plant*, 39, 490-495. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1079%2FIVP2003458>
- Debnath, S. (2006). Influence of propagation method and índole-3-butyric acid on growth and development of *in vitro*- and *ex vitro*- derived lingonberry plants. *Canadian Journal of Plant Science*, 86(1), 235-243. Recuperado de <https://doi.org/10.4141/P04-142>
- Diario Gestión (2017). Buscan obtener variedades peruanas de arándanos a través de su domesticación. *Gestión*. 28 abr. Recuperado de <https://gestion.pe/economia/buscan-obtener-variedades-peruanas-arandanos-traves-domesticacion-133961-noticia/>
- Dokoozlian, N. K. (2001). CPPU: A potential new plant growth regulator for California table grapes. *Grape Notes Newsletter*, 1, 1-4.
- Erig, A. C., y Schuch, M. W. (2006). Fatores Que afetam a Multiplicação *in vitro* de Mirtilo. *Scientia Agraria*, 7(1-2), 83-88. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/995/99516263012.pdf>
- Fairlie, T., Morales, M., y Holle, M. (1999). *Raíces y tubérculos: avances andinos I*. Lima, Perú: CIP y CONDESAN. Recuperado de <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/10/RTA59120.pdf>

- Fernández, S. A. (2012). *Caracterización Morfológica de Cavendishia bracteata y Macleania rupestris (Ericaceae) en la Sabana de Bogotá* (tesis de pregrado). Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10554/11879>
- Fuentes, V. (2008). *Estudio del mortiño y propuesta gastronómica aplicada a un recetario* (tesis de pregrado). Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador.
- George, E. (1993). *Plant propagation by tissue culture*. Part 1: the Technology. Second edition. Great Britain: Butler & Tanner.
- Gómez, E. (2002). *Fundamentos físicoquímicos relacionados con el cultivo de tejidos in vitro*.
- Gonzalez, M., Lopez, M., Valdez, A., y Ordás, R. (2000). Micropropagation of three Berry fruit species using nodal segments from field grown plants. *Annals of Applied Biology*, 137(1), 73-78. doi: 10.1111/j.1744-7348.2000.tb00059.x
- Guzmán, I., Adame, J., y Pacheco, R. (2005). Evaluación de la micropropagación por cultivo de tejidos vegetales *in vitro* en dos especies de Passifloras (*Passiflora popenovii* Killip & *Passiflora edulis* Sims). *Pérez-Arbelaezia*, (16), 73-103. Recuperado de <http://repository.udistrital.edu.co/handle/11349/1256>
- Hazarika, B. (2006). Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108, 105-120. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038>
- Hooker, W. J. (1837). *Icones Plantarum*. London.
- Howell, S. H., Lall, S., y Che, P. (2003). Cytokinins and shoot development. *Trends Plant Science*, 8(9), 453-459. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00191-2
- Huamantupa, I. (2008). Una especie de *Demosthenesia* (Ericaceae) del Cusco, Perú. *Revista peruana de biología*, 15(2), 079-081. doi: 10.15381/rpb.v15i2.1727
- Hurtado, D., y Merino, M. (1997). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Primera Edición. Distrito Federal, México: Trillas.

- Huxley, A. (1992). *The new royal horticultural society dictionary of gardening*. New York, USA: Stockton Press.
- INFOAGRO (2009). Arándano, Arándanos, Arándano europeo, Mirtilo, Rasponera, Uva de bosque, Uva de monte. Recuperado de <http://articulos.infojardin.com/Frutales/fichas/arandano-arandanos.htm?iframe=true&width=90%&height=90%>
- JBICM (2006). *Fenología Del Desarrollo Floral y De La Fructificación En 5 Especies De Frutales Nativas Del Bosque Alto Andino y Cultivadas En El Campus Del Jardín Botánico JCM*. Bogotá, Colombia: Jardín Botánico José Celestino Mutis.
- Kakimoto, T. (2003). Biosynthesis of cytokinins. *J Plant Research*, 116(3), 233-239. doi: 10.1007/s10265-003-0095-5
- Kakimoto, T. (2003). Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 605-207. Recuperado de <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134802>
- Klee, H., y Estelle, M. (1991). Molecular genetics approaches to plant hormone biology. *Annual Review of Plant Biology*, 42, 529-51. Recuperado de <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.002525>
- Krikorian, A. D. (1995). Hormones in tissue culture and micropropagation. *Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology* (774-796). Netherlands: Kluwer Academic Publishers. doi: 10.1007/978-94-011-0473-9\_35
- Lagos-Burbano, T. C., Ordoñez-Jurado, H., Criollo-Escobar, H., Burbano, S., y Martínez, Y. (2010). Descripción de Frutales Nativos de la familia Ericaceae en el altiplano de Pasto, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 4, 9-18. Recuperado de <http://www.soccolhort.com/revista/pdf/magazin/Vol4/vol.4%20no.1/Vol.4.No.1.Art.1.pdf>
- Letham, D. S. (1973). Cytokinins from *Zea mays*. *Phytochemistry*, 12(10), 2445-2455. Recuperado de [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80453-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80453-4)

- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., y Mroginski, L. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *Biotecnología y mejoramiento vegetal II* (21-22). Argentina: Instituto nacional de tecnología agropecuaria. Recuperado de <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/BiotecnologiayMejoramientovegetalII.pdf>
- Luteyn, J., y Pedraza, P. (2008). Neotropical blueberries: The plant family Ericaceae. The New York Botanical Garden. Recuperado de <http://www.nybg.org/bsci/res/lut2>
- Luteyn, J. L. (2002). Diversity, adaptation and endemism in neotropical Ericaceae: Biogeographical patterns in the Vaccinieae. *The Botanical Review*, 68 (1), 55-87. doi: 10.1663/0006-8101(2002)068[0055:DAAEIN]2.0.CO;2
- Luteyn, J. L. (2007). *Neotropical Blueberries: The Plant Family Ericaceae*. Nueva York, Estados Unidos.
- Mok, D. W., y Mok, M. C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiol Plant Mol. Biol.*, 52, 89-118. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.89
- Mora, L. E. (1987). *Estudios morfológicos, autoecológicos y sistemáticos en angiospermas*. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Bogotá, Colombia: Editorial Kimpres.
- Muñoz, C. (1988). *Arándano: antecedentes generales*. Instituto de investigación agropecuaria. Seminario: el cultivo del arándano.
- Noboa, V. (2010). *Efecto de seis tipos de sustratos y tres dosis de ácido  $\alpha$ -naftalenacético en la propagación vegetativa de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)* (tesis de pregrado). Escuela superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/713/1/33T0067.pdf>
- Ostrolucká, M., Libiaková, G., Ondrusková, E., y Gajdosová, A. (2004). *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis, Biology*, 676, 207-212. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/267372943\\_In\\_vitro\\_propagation\\_of\\_In\\_vitro\\_propagation\\_of\\_In\\_vitro\\_Vaccinium\\_species\\_Vaccinium\\_species\\_Vaccinium](https://www.researchgate.net/publication/267372943_In_vitro_propagation_of_In_vitro_propagation_of_In_vitro_Vaccinium_species_Vaccinium_species_Vaccinium)

- Osuna-Ávila, P., y Saucedo, C. (2011). *Propagación in vitro de vid variedad Globo Rojo. Reportes técnicos de investigación*. Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez. México: Colección Textos Universitarios. Recuperado de <http://www3.uacj.mx/DGDCDC/SP/Documents/RTI/RTI/20.%20Propagaci%C3%B3n%20in%20vitro.pdf>
- Palacios, A. (1982). *Flora genérica de Colombia: familia Ericaceae, subfamilias: Rhododendroideae, Ericoideae, Vaccinioideae p.p y Arbutoideae* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Bogotá D. C., Colombia.
- Pallardy, S. G. (2008). *Physiology of Woody Plants*. Oxford, UK: Academic Press. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/281668999\\_Physiology\\_of\\_Woody\\_Plants](https://www.researchgate.net/publication/281668999_Physiology_of_Woody_Plants)
- Pennington, J., y Fisher, R. (2009). Classification of fruit and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(3), 1-9. doi: 10.1016/j.jfca.2008.11.012
- Pierik, R. L. M. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Poma, M. (2014). *Efecto de dos medios de cultivo en la introducción de ápices vegetativos de tres morfotipos de Arracacha (Arracacia xanthorrhiza Bancroft) en condiciones de in vitro* (tesis de pregrado). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. Recuperado de <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/5263>
- Quezada, J. A., Ascarrunz, M. E., y Silva, M. A. (2000). Evaluación del potencial de regeneración de dos ecotipos de ajo (*Allium sativum* L.) en el proceso de microbulbificación *in vitro*. *Biofarba*, 8(8), 86-90. Recuperado de <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-316104>
- Quintero, I., Polo, J., Jarma, A., y Espitia, A. (2013). Enraizamiento *in vitro* de *Dioscorea* sp. *Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 51-56. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/575/1112>

- Rázuri, T. (2014). *Taxonomía, ecogeografía, potencial agroindustrial y distribución geográfica del Vaccinium en el Perú* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú. Recuperado de <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/4504>
- Reed, B., y Abdelnour-Esquivel, A. (1991). The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *HortScience*, 26(10), 1320-1332. Recuperado de <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.26.10.1320>
- Reynolds, A., Wardle, D., Zurowski, C., y Looney, N. (1992). Phenylureas CPPU and thidiazuron affect yield components, fruit composition, and storage potential of four seedless grape selections. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 117, 85-89. Recuperado de <https://doi.org/10.21273/JASHS.117.1.85>
- Rodríguez, M., y 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. *Scientia Agropecuaria*, 6(1), 31-40. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.03>
- Rodríguez, R., y Peña, S. (1984). *Flora de los Andes: cien especies del altiplano Cundiboyacense.-CAR*. Escala. Bogotá, Colombia: Benjamín Villegas & Asociados. Recuperado de <http://hdl.handle.net/20.500.11786/33732>
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol.*, 57(1), 431-449. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231
- Salinas, N. R., y Betancourt, J. (2005). *Las Ericáceas de la vertiente pacífica de Nariño*. Bogotá, D.C., Colombia: Instituto de Ciencias Naturales e Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Sanjinés, A., Øllgaard, B., y Balslev, H. (2006). Frutos comestibles. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Recuperada de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000075&pid=S0120-9965201100020000500030&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000075&pid=S0120-9965201100020000500030&lng=en)



- Shiram, V., Kumar, V., y Shitole, M. (2008). Indirect organogenesis and plant regeneration in *Helicteres isora* L., an important medicinal plant. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 44(3), 186-193. doi: 10.1007/s11627-008-9108-3
- Skoog, F., y Miller, CO. (1965). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. En *Molecular and Cellular Aspects of Development* (481-494). New York: Harper and Rowpp.
- Smith, Pm., y Atkins, Ca. (2002). Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology*, 128(3), 793-802. doi: 10.1104/pp.010912
- Squeo, F., y Cardemil, L. (2006). *Fisiología vegetal*. La Serena, Chile: Ediciones Universidad de La Serena.
- Tapia, E., y Fries, A. (2007). *Guía de campo de los cultivos andinos*. Lima: FAO y ANPE
- Troncoso, A., Matte, C., Venegas, M. J. y Cantos, M. (1997). Influencia de la concentración de sacarosa en el medio, sobre la respuesta de material de vid “*in vitro*”. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10261/66626>
- Van den Eynden, V., Cueva, E., y Cabrera, O. (1999). *Plantas silvestres comestibles del Sur del Ecuador*. Quito, Ecuador: Ediciones Abya - Yala.
- Williams, R. (1995). The chemical microenvironment. En Aitke, J. (Ed.), *Automation and environmental control in plant tissue culture* (405-439). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Wolfe, D. E., Eck, P., y Chin, C. K. (1983). Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry. *HortScience*, 18(5), 703–705. Recuperado de <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=9545895>
- Zobayed, S., Armstrong, J., y Armstrong, W. (2001). Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. *Annals of Botany*, 87(1), 53-59. Recuperado de <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1299>

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1: Medio de cultivo Woody Plant

<b>MEDIO WP (Loyd and McCown, 1980)</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (mg/L)</b>
<b>MACRONUTRIENTES</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	990
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	96
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	556
<b>MICRONUTRIENTES</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.2
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.25
FeSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	27.8
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
<b>ORGANICOS</b>	
Piridoxina HCl	0.5
Glicina	2
Acido nicotínico	0.5
Tiamina HCl	1
<b>OTROS</b>	
Myo-inositol	100
Sacarosa	20 g
Agar	6 g
pH	5.6

**Anexo 2:** Resultados totales de cada unidad experimental a los 60 días de siembra

**Anexo 2.1:** Resultados totales de cada unidad experimental de las variables a los 60 días de la siembra de *Vaccinium floribundum* Kunth (“pushgay”)

Tratamiento	Repetición	Longitud del explante	Número de brotes	Número de hojas	Número de raíces
WP	1	1.18	3.8	21	0
	2	1.84	2.2	19.6	0
	3	1.92	2.4	25.6	0
	4	1.38	3	19.4	0
	5	1.28	5.4	29	0
	6	1.37	2.4	10	0
	7	1.42	3	12	0
ZEA 0.5	1	1.26	5.2	40.8	0
	2	1.19	5.8	50.8	0
	3	1.34	6	44.6	0
	4	1.06	5.2	36.2	0
	5	1.11	5.8	49.2	0
	6	1.21	5.6	46	0
	7	1.12	6	28	0
KIN 0.5	1	2.24	2.4	26.2	0
	2	2.18	1.4	20	0
	3	1.66	2.2	20.6	0
	4	2	1.4	21	0
	5	1.68	1.6	16.6	0
	6	1.44	2.6	19.8	0
	7	1.6	1.8	18.2	0
KIN 1.0	1	2.02	2.6	19	0.4
	2	1.86	2.4	18.8	1.2
	3	2.2	2.8	24.4	1.4
	4	1.82	2.6	17.4	0.2
	5	2.07	3.4	25.4	2.2
	6	2.08	3.6	19.8	0.2
	7	1.88	2	17.6	0

**Anexo 2.2:** Resultados totales de cada unidad experimental de las variables a los 60 días de la siembra de *Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith (“alicon”).

Tratamiento	Repetición	Longitud del explante	Número de brotes	Número de hojas	Número de raíces
WP	1	1.4	1	3	2.8
	2	1.33	1	3.6	2.8
	3	2.1	1	4	3.6
	4	0.94	1	1.8	2.4
	5	1.06	1	1.6	1.6
	6	1.1	1	2.2	3
	7	0.64	1	2.2	2.2
ZEA 0.5	1	1.46	2	9.6	0
	2	1.31	1.6	6	0
	3	1.44	3.2	12.4	0
	4	1.53	2.8	10.8	0
	5	1.44	2.6	9.4	0
	6	1.28	2	7.8	0
	7	1.34	3	9.2	0
KIN 0.5	1	1.19	1	4	1.2
	2	1.3	1.4	4.4	3.8
	3	1.47	1.4	3	7
	4	1.36	1	2.8	3.4
	5	1.7	1.2	4.4	3.8
	6	1.86	1.6	4.2	4.4
	7	1.56	1.2	3	3
KIN 1.0	1	1.56	1.4	3.8	4.8
	2	1.68	1.6	3.6	3.6
	3	1.18	1.8	4	1.4
	4	1.12	1.4	2.2	3.8
	5	1.24	1.4	3.4	2.8
	6	1.26	1.4	3.2	2.6
	7	1.37	1.4	3.6	3.8

**Anexo 3:** Resultados totales de cada unidad experimental a los 120 días de siembra

**Anexo 3.1:** Resultados totales de cada unidad experimental de las variables a los 120 días de la siembra de *Vaccinium floribundum* Kunth (“pushgay”)

Tratamiento	Repetición	Longitud del explante	Número de brotes	Número de hojas	Número de raíces
WP	1	1.38	4.40	30.20	0.00
	2	2.16	2.80	24.80	3.20
	3	2.60	2.60	34.40	1.40
	4	1.72	4.40	26.20	0.00
	5	1.98	6.40	38.60	0.00
	6	2.44	2.60	30.20	1.40
	7	2.14	3.80	31.40	2.60
ZEA 0.5	1	1.62	10.20	121.20	0.00
	2	1.44	9.80	94.60	0.00
	3	1.86	10.80	104.20	0.00
	4	1.92	13.00	151.00	0.00
	5	1.56	10.20	98.60	0.00
	6	1.64	10.00	81.40	0.00
	7	1.67	12.40	102.60	0.00
KIN 0.5	1	3.48	2.80	37.60	1.20
	2	2.45	1.60	24.20	0.40
	3	2.52	2.60	30.80	0.60
	4	2.24	1.40	24.40	0.40
	5	2.74	1.80	27.60	1.00
	6	1.96	3.00	27.20	0.40
	7	2.76	2.40	29.40	1.00
KIN 1.0	1	5.44	4.60	47.00	4.20
	2	3.02	3.20	31.80	1.40
	3	4.86	4.40	51.20	2.00
	4	2.86	3.40	32.00	0.80
	5	2.88	3.40	26.80	2.60
	6	2.44	3.60	27.00	1.40
	7	3.24	3.00	30.40	1.00

**Anexo 3.2:** Resultados totales de cada unidad experimental de las variables a los 120 días de la siembra de *Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith (“alicon”)

Tratamiento	Repetición	Longitud del explante	Número de brotes	Número de hojas	Número de raíces
WP	1	2.09	1.00	5.20	3.60
	2	2.29	1.00	4.60	2.40
	3	4.15	1.00	6.80	5.20
	4	2.19	1.00	4.60	4.40
	5	1.72	1.00	3.80	3.20
	6	1.98	1.00	4.40	4.80
	7	1.37	1.00	4.40	4.60
ZEA 0.5	1	2.36	2.40	15.20	0.00
	2	1.96	2.20	9.80	0.00
	3	2.37	4.60	21.20	0.00
	4	2.76	3.40	18.00	0.00
	5	2.26	2.80	15.60	0.00
	6	1.94	2.60	14.60	0.00
	7	2.22	4.20	16.60	0.00
KIN 0.5	1	2.60	1.20	7.20	3.80
	2	2.13	1.40	6.60	4.20
	3	2.66	1.40	6.40	8.00
	4	2.44	1.00	4.80	4.60
	5	2.84	1.20	7.40	5.20
	6	3.95	1.60	6.80	5.20
	7	2.62	1.20	5.20	4.80
KIN 1.0	1	3.28	1.40	6.20	5.40
	2	3.24	1.60	6.00	4.40
	3	2.02	2.20	6.00	2.40
	4	2.10	1.00	4.00	3.80
	5	2.88	1.60	5.60	4.60
	6	2.59	1.40	4.60	3.80
	7	2.67	1.40	5.80	4.40

## Anexo 4: Prueba estadística a los 60 días de siembra

### Anexo 4.1: Resultados de análisis de varianza y prueba estadística Tukey para *Vaccinium floribundum* (“pushgay”) a los 60 días de siembra

#### Longitud del tallo

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Pushgay	Longitud del tallo	28	0.69	0.65	13.95

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2.72	3	0.91	17.73	<0.0001
Tratamiento	2.72	3	0.91	17.73	<0.0001
Error	1.23	24	0.05		
Total	3.95	27			

#### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.33352

Error: 0.0512 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
KIN 1.0	1.99	7	0.09 A
KIN 0.5	1.83	7	0.09 A
WP	1.48	7	0.09 B
ZEA 0.5	1.18	7	0.09 B

#### Brotos adventicios

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Pushgay	Brotos adventicios	28	0.82	0.80	20.54

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	54.23	3	18.08	37.55	<0.0001
Tratamiento	54.23	3	18.08	37.55	<0.0001
Error	11.55	24	0.48		
Total	65.79	27			

#### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.02311

Error: 0.4814 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
ZEA 0.5	5.66	7	0.26 A
WP	3.17	7	0.26 B
KIN 1.0	2.77	7	0.26 B C
KIN 0.5	1.91	7	0.26 C

#### Numero de hojas

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Pushgay	Numero de hojas	28	0.77	0.74	22.20

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2581.74	3	860.58	26.63	<0.0001
Tratamiento	2581.74	3	860.58	26.63	<0.0001
Error	775.50	24	32.31		
Total	3357.24	27			

#### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=8.38186

Error: 32.3124 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
ZEA 0.5	42.23	7	2.15 A
KIN 0.5	20.34	7	2.15 B
KIN 1.0	20.34	7	2.15 B
WP	19.51	7	2.15 B

#### Numero de raices

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Pushgay	Numero de raices	28	0.46	0.39	204.12

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3.36	3	1.12	6.72	0.0019
Tratamiento	3.36	3	1.12	6.72	0.0019
Error	4.00	24	0.17		
Total	7.36	27			

#### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.60198

Error: 0.1667 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
KIN 1.0	0.80	7	0.15 A
ZEA 0.5	0.00	7	0.15 B
WP	0.00	7	0.15 B
KIN 0.5	0.00	7	0.15 B

## Anexo 4.2: Resultados de análisis de varianza y prueba estadística Tukey para *Macleania rupestris* (“alicon”) a los 60 días de siembra

### Longitud del tallo

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Alicon	Longitud del tallo	28	0.12	0.01	20.66

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.26	3	0.09	1.10	0.3688
Tratamiento	0.26	3	0.09	1.10	0.3688
Error	1.91	24	0.08		
Total	2.17	27			

### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.41574

Error: 0.0795 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
KIN 0.5	1.49	7	0.11 A
ZEA 0.5	1.40	7	0.11 A
KIN 1.0	1.34	7	0.11 A
WP	1.22	7	0.11 A

### Brotos adventicios

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Alicon	Brotos adventicios	28	0.77	0.74	21.16

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8.51	3	2.84	26.35	<0.0001
Tratamiento	8.51	3	2.84	26.35	<0.0001
Error	2.58	24	0.11		
Total	11.09	27			

### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.48373

Error: 0.1076 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
ZEA 0.5	2.46	7	0.12 A
KIN 1.0	1.49	7	0.12 B
KIN 0.5	1.26	7	0.12 B C
WP	1.00	7	0.12 C

### Numero de hojas

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Alicon	Numero de hojas	28	0.85	0.83	25.52

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	198.02	3	66.01	44.79	<0.0001
Tratamiento	198.02	3	66.01	44.79	<0.0001
Error	35.37	24	1.47		
Total	233.39	27			

### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.79010

Error: 1.4738 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
ZEA 0.5	9.31	7	0.46 A
KIN 0.5	3.69	7	0.46 B
KIN 1.0	3.40	7	0.46 B
WP	2.63	7	0.46 B

### Numero de raices

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Alicon	Numero de raices	28	0.68	0.64	44.42

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	59.54	3	19.85	17.15	<0.0001
Tratamiento	59.54	3	19.85	17.15	<0.0001
Error	27.77	24	1.16		
Total	87.31	27			

### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.58617

Error: 1.1571 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
KIN 0.5	3.80	7	0.41 A
KIN 1.0	3.26	7	0.41 A
WP	2.63	7	0.41 A
ZEA 0.5	0.00	7	0.41 B



## Anexo 5: Prueba estadística a los 120 días de siembra

### Anexo 5.1: Resultados de análisis de varianza y prueba estadística Tukey para *Vaccinium floribundum* (“pushgay”) a los 120 días de siembra

#### Longitud del tallo

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Pushgay	Longitud del tallo	28	0.57	0.51	26.72

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13.66	3	4.55	10.49	0.0001
Tratamiento	13.66	3	4.55	10.49	0.0001
Error	10.41	24	0.43		
Total	24.07	27			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.97120

Error: 0.4338 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
KIN 1.0	3.53	7	0.25 A
KIN 0.5	2.59	7	0.25 A B
WP	2.06	7	0.25 B
ZEA 0.5	1.67	7	0.25 B

#### Brotos adventicios

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Pushgay	Brotos adventicios	28	0.92	0.92	20.35

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	322.11	3	107.37	98.29	<0.0001
Tratamiento	322.11	3	107.37	98.29	<0.0001
Error	26.22	24	1.09		
Total	348.32	27			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.54114

Error: 1.0924 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
ZEA 0.5	10.91	7	0.40 A
WP	3.86	7	0.40 B
KIN 1.0	3.54	7	0.40 B C
KIN 0.5	2.23	7	0.40 C

#### Numero de hojas

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Pushgay	Numero de hojas	28	0.89	0.87	25.12

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	30535.42	3	10178.47	63.00	<0.0001
Tratamiento	30535.42	3	10178.47	63.00	<0.0001
Error	3877.70	24	161.57		
Total	34413.12	27			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=18.74294

Error: 161.5710 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
ZEA 0.5	107.66	7	4.80 A
KIN 1.0	35.17	7	4.80 B
WP	30.83	7	4.80 B
KIN 0.5	28.74	7	4.80 B

#### Numero de raices

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Pushgay	Numero de raices	28	0.42	0.34	93.17

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13.75	3	4.58	5.68	0.0044
Tratamiento	13.75	3	4.58	5.68	0.0044
Error	19.37	24	0.81		
Total	33.12	27			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.32474

Error: 0.8071 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
KIN 1.0	1.91	7	0.34 A
WP	1.23	7	0.34 A B
KIN 0.5	0.71	7	0.34 A B
ZEA 0.5	0.00	7	0.34 B

**Anexo 5.2:** Resultados de análisis de varianza y prueba estadística Tukey para *Macleania rupestris* (“alicon”) a los 120 días de siembra

**Longitud del tallo**

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Alicon	Longitud del tallo	28	0.14	0.04	24.20

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.46	3	0.49	1.34	0.2842
Tratamiento	1.46	3	0.49	1.34	0.2842
Error	8.70	24	0.36		
Total	10.16	27			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.88801**

Error: 0.3627 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
KIN 0.5	2.75	7	0.23 A
KIN 1.0	2.68	7	0.23 A
ZEA 0.5	2.27	7	0.23 A
WP	2.26	7	0.23 A

**Brotos adventicios**

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Alicon	Brotos adventicios	28	0.78	0.75	28.54

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20.26	3	6.75	27.75	<0.0001
Tratamiento	20.26	3	6.75	27.75	<0.0001
Error	5.84	24	0.24		
Total	26.10	27			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.72737**

Error: 0.2433 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
ZEA 0.5	3.17	7	0.19 A
KIN 1.0	1.49	7	0.19 B
KIN 0.5	1.26	7	0.19 B
WP	1.00	7	0.19 B

**Numero de hojas**

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Alicon	Numero de hojas	28	0.87	0.85	23.57

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	566.62	3	188.87	51.53	<0.0001
Tratamiento	566.62	3	188.87	51.53	<0.0001
Error	87.97	24	3.67		
Total	654.59	27			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.82298**

Error: 3.6652 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
ZEA 0.5	15.86	7	0.72 A
KIN 0.5	6.34	7	0.72 B
KIN 1.0	5.46	7	0.72 B
WP	4.83	7	0.72 B

**Numero de raices**

Especies	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Alicon	Numero de raices	28	0.83	0.81	29.16

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**




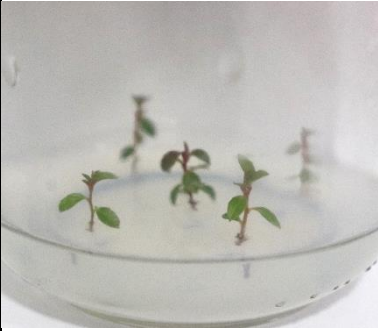
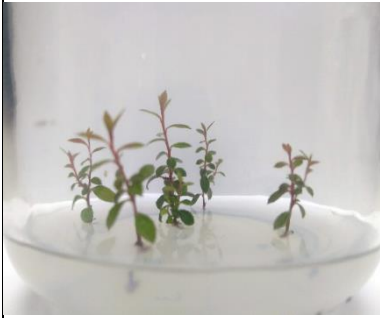




F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	107.62	3	35.87	38.42	<0.0001
Tratamiento	107.62	3	35.87	38.42	<0.0001
Error	22.41	24	0.93		
Total	130.03	27			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.42490**

Error: 0.9338 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
KIN 0.5	5.11	7	0.37 A
KIN 1.0	4.11	7	0.37 A
WP	4.03	7	0.37 A
ZEA 0.5	0.00	7	0.37 B

**Anexo 6:** Fotos de *Vaccinium floribundum* Kunth

<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth ("pushgay") Tratamiento: WP		
0 días	60 días	120 días
		
		
		

<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth ("pushgay") Tratamiento: WP + ZEA 0.5ppm		
0 días	60 días	120 días
		
		
		



*Vaccinium floribundum* Kunth ("pushgay")  
 Tratamiento: WP + KIN 0.5ppm

0 días	60 días	120 días
		
		
		

<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth ("pushgay") Tratamiento: WP + KIN 1.0ppm		
0 días	60 días	120 días
		
		
		



**Anexo 7:** Fotos de *Macleania rupestris* Kunth A. C. Smith

<i>Macleania rupestris</i> Kunth A. C. Smith (“alicon”) Tratamiento: WP		
0 días	60 días	120 días
		
		
		

<i>Macleania rupestris</i> Kunth A. C. Smith (“alicon”) Tratamiento: WP + ZEA 0.5ppm		
0 días	60 días	120 días
		
		
		



<p><i>Macleania rupestris</i> Kunth A. C. Smith (“alicon”)  Tratamiento: WP + KIN 0.5ppm</p>		
0 días	60 días	120 días
		
		
		

<i>Macleania rupestris</i> Kunth A. C. Smith (“alicon”) Tratamiento: WP + KIN 1.0ppm		
15 días	60 días	120 días
		
		
		