



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

**"CULTIVO *IN VITRO* Y BIOPROSPECCIÓN DE FRUTOS Y HOJAS DEL
Vaccinium floribundum Kunth"**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MAGISTER EN BIOCENCIAS APLICADAS CON MENCIÓN EN
BIODESCUBRIMIENTO**

Presentado por Susana Alexandra Llivisaca Contreras

Director: Juan Manuel Cevallos Cevallos

Codirector: Jeny Cumandá Ruales Nájera

Guayaquil – Ecuador

2017

Agradecimiento

A mi madre

Por ser un ejemplo de rectitud y de perseverancia. Porque sus consejos se disminuían frente a una figura que plasmaba sus obras durante todo el trayecto de su vida dándole sentido a la mía. Así, Doña Carmen continuará viva en mi mente y en mi corazón por siempre

A mi padre

Más que un ejemplo de lealtad hacia mi madre y a sus seres queridos, Don José, es el pilar central en el que mi familia se apoya, logrando convertirse en la imagen de buen padre que mis hijas necesitan, brindándoles seguridad y confianza ante la vida

A mis amigos

Que nos apoyamos mutuamente en las adversidades y triunfos personales y laborales. Acrecentando con más fuerza, el valor de una verdadera amistad. De todo corazón: Jeffrey, Lizette, Mafer, Carlos y a todos los chicos que conforman el grupo de "Tardes de Té" del whatsapp

A mis hijas

A pesar de que en algún momento de mi vida aumentaron mis responsabilidades y sacrificios, ellas fueron sobretodo el motor que impulsó cada fibra de mi corazón palpitara más fuerte volviéndolo imbatible, transcribiendo esta mezcla de emociones y sobresaltos en logros, donde Camila, Sara, Rebecca y Mozy siempre estarán presentes para disfrutarlos a mi lado

Finalmente, a VLIR-OUS e IFS por brindarme su la ayuda financiera, al CIBE-ESPOL por haberme permitido realizar mis estudios de maestría y a los maestros en general, a mis cotutores el máster Flores, la Dra. Ruales y a la Dra. Patricia Manzano, y uno muy especial a mi tutor el Dr. Juan Manuel Cevallos quien marcó cada etapa de mi camino en lo laboral, personal y en la maestría. Cabe señalar que, este trabajo fue realizado bajo las estrictas normas y supervisión del Ministerio del Ambiente MAE-DNB-CM-2017-0055

Dedicatoria

A mi madre Carmen Contreras, a mi padre José Llivisaca y a mis hijas Camila y Sarita porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos. Uno de manera muy personal, al Doctor Rafael Correa Delgado, por su ejemplo de constante lucha para sacar adelante a mi país

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral".

Resumen

El mortiño es un tipo de arándano, conocido como “superfruto” con gran interés por sus compuestos bioactivos. Desde hace más de una década se ha tratado de obtener una metodología para establecer la multiplicación *in vitro* del *V. floribundum* en Ecuador, con resultados poco favorables. Estudios refieren una importante actividad antimicrobiana y como un bloqueador enzimático en el proceso de envejecimiento celular del extracto obtenido de las hojas del *Vaccinium sp.*; y, la presencia de grandes cantidades de vitamina C en su fruto. El presente estudio tiene como objetivo caracterizar polifenoles totales, determinar capacidad antioxidante y medir actividad antimicrobiana de las hojas y frutos del mortiño, establecer variabilidad genética y desarrollar un método de propagación *in vitro* de la especie *V. floribundum* que crece en Ecuador. La caracterización de antocianinas totales fue determinada por el método del pH diferencial y por cromatografía líquida de alta resolución en equipo HPLC-DAD; además de un barrido general de los extractos acuosos de la fruta y hojas en equipo de electroforesis capilar. La determinación de la capacidad antioxidante mediante ABTS y DPPH, la caracterización de actividad antimicrobiana frente a ocho bacterias Gram negativas: *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Salmonella Typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y tres Gram positivas: *Probionibacterium propionicum*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* mediante la técnica de pozos de difusión. La caracterización genética con PCR en las regiones *rbcl* y *matK*; y la elaboración de la metodología de propagación *in vitro* con el uso de yemas axilares a distintas concentraciones de hormonas. Los resultados indicaron que los frutos y hojas contienen un rango de 146.1 (DS \pm 13.44) y 229.81 (DS \pm 2.67) mg EqAG/100 g respectivamente de polifenoles totales, y una capacidad antioxidante de \bar{X} 11.01 mmol EqT/100 g. Se observó la presencia \bar{X} 1095,39 mg/100 g de antocianinas totales en frutos y un rango de CI_{50} entre 0,018 (DS \pm 0.001) y 0.296 (DS \pm 0.030) mg/mL en el extracto de hoja. Los halos de inhibición tuvieron rangos de radios entre 4 a 19.83 mm tanto con el extracto de fruta como de hoja, algunos incluso superiores a los observados con el antibiótico ampicilina (control +); el método de agrupamiento Neighbor Joining (NJ) de la región *matK* reveló una distancia genética de 0,002 en el grupo de plantas colectadas en la provincia de Cotopaxi con respecto a las del grupo de Carchi y Pichincha y la del NCBI (AF382907), con lo que se logró detectar un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en la posición 739 del gen *maturase k*. Los resultados del presente estudio son únicos para la especie *V. floribundum*, sugiriendo que posee variabilidad genética, cuyas secuencias se encuentran en la base de datos NCBI (KP973417.1, KP973415.1, KP973418.1, KP973416.1, KP973414.1), confirmándose además la autenticidad de la especie. En cuanto a la micro propagación con el uso del dióxido de cloro y carbendazím se obtuvo 100 % de desinfección, además, la fase de establecimiento de los brotes de las plantas alcanzó un factor de multiplicación de 10,33 usando una combinación de IAA y BAP a 10 μ mol de concentración de cada hormona, lo cual servirá de base para

estudios posteriores de producción de plantas sanas en el cultivo de esta especie con potencial de uso para la industria alimenticia y farmacéutica.

Índice General

1.	Introducción y objetivos	1
1.1	Antecedentes y justificación	1
1.2	Objetivo general.....	2
1.3	Objetivos específicos	2
2.	Marco Teórico	3
2.1	Caracterización química.....	3
2.2	Caracterización biológica	3
2.3	Caracterización genética.....	4
2.4	Desarrollo de un método de micropropagación.....	4
3.	Metodología.....	6
3.1	Colección y preparación de las muestras.....	8
3.2	Caracterización química	8
3.2.1	Polifenoles totales con el reactivo Folin-Ciocalteu	8
3.2.2	Barrido de los extractos alcohólicos y acuosos.....	9
3.2.3	Determinación de antocianinas totales	10
3.2.4	Capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	11
3.3	Caracterización biológica	12
3.4	Caracterización genética.....	13
3.5	Micropropagación.....	14
3.6	Análisis estadístico	15
4.	Resultados.....	15
4.1	Caracterización química.....	15
4.2	Caracterización biológica	20
4.3	Caracterización genética.....	24
4.4	Micropropagación.....	30
4.4.1	Fase de Desinfección.....	30
4.4.1.1	Dióxido de cloro	30
4.4.1.2	Fungicida Carbendazím	31
4.4.2	Fase de restablecimiento	32
5.	Conclusiones	33

6. Recomendaciones.....	34
7. Bibliografía	34

Índice de Tablas

Tabla I. Preparación de diluciones a partir del extracto de hoja.....	11
Tabla II. Compuestos identificados en frutos y hojas por barrido en Electroforesis Capilar	20
Tabla III. Las categorías de rangos de halos de inhibición obtenidos mediante pruebas <i>in vitro</i>	23
Tabla IV. Secuencias de la región genética matK y rbcL subidas a la base de datos del NCBI.	27
Tabla V. Comparación de distancias genéticas con el método pairwise distances de MEGA	28
Tabla VI. Tasa de multiplicación	33
Tabla VII. Tiempo de retención y área de los picos obtenidos del cromatograma del HPLC	45
Tabla VIII. Matriz de hormonas para esquejes.....	45

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Esquema de trabajo.....	7
Gráfico 2. Comparación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu.....	16
Gráfico 3. Polifenoles totales por Folin-Ciocalteu de frutos y hojas provenientes de Pichincha, de Chimborazo, y comerciales.....	16
Gráfico 4. Análisis CI50 de DPPH de hojas pulverizadas.....	17
Gráfico 5. Capacidad antioxidante mediante ABTS de frutas y hojas del mortiño	17
Gráfico 6. Concentración de antocianinas por pH diferencial en frutos y hojas de mortiño.....	18
Gráfico 7. Cromatograma de una representativa caracterización de antocianinas por HPLC.....	19
Gráfico 8. Medición de halos de inhibición en medio TSA.....	21
Gráfico 9. Medición de halos de inhibición en medio LB agar	22
Gráfico 10. Halos de inhibición B. gladioli; E. faecalis; S. Typhimurium; V. parahaemolyticus	23
Gráfico 11. Análisis de correspondencia entre bacterias y tamaño de halo	24
Gráfico 12. Análisis de correspondencia entre la clase de resistencia y el tamaño del halo	24
Gráfico 13. Árbol filogenético de la región matK	25
Gráfico 14. Árbol filogenético de la región rbcL.....	26
Gráfico 15. Efecto del dióxido de cloro en la desinfección de explantes	30
Gráfico 16. Efecto de la concentración del caberdazím sobre la desinfección de explantes.....	31
Gráfico 17. Desinfección con ClO ₂ al 2 %; Carbendazim (0.1; 0.5: 1%) en medio MS	31
Gráfico 18. Medio WPM (IAA y BAP 10 uM); Brotes de 3 semanas; Primera generación	32
Gráfico 19. Brotes de 5 semanas de mortiño en medio WPM modificado.....	33
Gráfico 20. Espectro de ácido ascórbico estándar (1000 ppm)	45
Gráfico 21 Electroferograma de hojas a 268 nm (Ácido Ascórbico).....	46
Gráfico 22. Electroferograma de hojas a 210 nm (polifenoles)	46
Gráfico 23. Tiempo 2.043 min (ácido fenólico, derivado ácido benzoico) en hojas.....	46
Gráfico 24. Tiempo 2.396 (derivado de narangenina)	47
Gráfico 25. Tiempo 3.043 (Derivado de ácido gálico)	47
Gráfico 26. Tiempo 3.203 desconocido 1.....	47
Gráfico 27. Tiempo 3.296 Desconocido 2	48
Gráfico 28. Tiempo 3.443 Desconocido 3	48
Gráfico 29. Tiempo 3.736 Desconocido 4	48
Gráfico 30. Tiempo 4.123 Desconocido 5	49
Gráfico 31. Electroferograma fruta de mortiño (270 nm), (sin ácido ascórbico)	49
Gráfico 32. Electroferograma 268 nm (Fruta + Ácido Ascórbico 100:100:800)	49
Gráfico 33. Electroferograma 268 fruta (Diluido 10 veces).....	50
Gráfico 34. Electroferograma a 210 nm fruta de mortiño	50
Gráfico 35. Tiempo 2.609 desconocido 6.....	50

Gráfico 36. Tiempo 3.409 ácido fenólico derivado de ácido siríngico.....	51
Gráfico 37. Tiempo 3.589 desconocido 7.....	51
Gráfico 38. Tiempo 4.069 desconocido 8.....	51

ABREVIATURAS

ABTS=	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid
ADN=	Ácido desoxirribonucleico
AIA=	Ácido indolacético
AIB=	Ácido indolbutírico
ANA=	Ácido naftalacético
BAP=	Benzilaminopurina
CIBE=	Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador
CE ₅₀	Concentración del extracto requerida para captar el 50 % de DPPH
CTAB=	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DPPH=	2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl
EC=	Electroforesis capilar
EqAG=	Equivalentes de ácido gálico
EqT=	Equivalente de TROLOX
HPLC-DAD=	High performance liquid chromatography- Diode-Array Detection
LB=	Luria Bertani agar
matK=	Megakaryocyte-Associated Tyrosine Kinase
MEGA=	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MS=	Murashige y Skoog
NCBI=	National Center for Biotechnology Information
NCCLS=	Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de Estados Unidos
pH=	Potencial de Hidrógeno
rbcl=	Ribulose bisophosphate carboxylase
ROS =	Especies de oxígeno reactivo
TROLOX=	ácido3,4-dihidro-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2H-1-benzopiran-2-carboxílico
TSB=	Agar tripticasa soya
UV=	Ultravioleta
WPM=	Wood Plant Medium
PCR=	Polymerase chain reaction
SNP=	Polimorfismo de nucleótido único

1. Introducción y objetivos

1.1 Antecedentes y justificación

El género *Vaccinium*, nombre establecido por el científico, naturalista y botánico sueco, Carl von Linné en el año de 1737, comprende varios cultivos de la zona templada como el del arándano, y la base genética se encuentra conformada por *V. ashei*, *V. angustifolium* y *V. corymbosum* (1). El mortiño (*V. floribundum*) es un tipo de arándano que crece de forma espontánea en la zona altoandina ecuatoriana y que presenta un fruto agradablemente dulce, empleado mayormente en la preparación de mermeladas, bebida alcohólica similar al vino tinto y el de la colada morada que es elaborada tradicionalmente en el día de los difuntos. El arándano en general es conocido a nivel mundial como “superfruto” con un gran interés por el contenido de compuestos bioactivos (2). Estudios realizados en Colombia en *Vaccinium meridionale*, demostraron el establecimiento eficiente de la producción mediante la aplicación de un protocolo de germinación de semillas (3) y de micropropagación (4).

Dada las importantes evidencias sobre los polifenoles en la salud humana y a la actividad antioxidante que posee *V. floribundum*, sus frutos son considerados adecuados para producción de bebidas alcohólicas (5,6). Se ha comprobado el efecto del extracto de hoja de *V. corymbosum* en la inhibición de la cataratogénesis, que dada su propiedad quelante que bloquea a las calpaínas, asociadas a la distrofia muscular, cáncer, Alzheimer, daño neurológico, diabetes y cataratas (6,7). Así mismo, se ha verificado las grandes cantidades de vitamina C en frutos de *V. corymbosum* y *meridionale* (8). Finalmente, el extracto de hoja del *V. corymbosum* fue utilizado como biocontrol, lograron inhibir el crecimiento del patógeno *Staphylococcus aureus* (9).

Con lo que respecta al mortiño ecuatoriano, se conoce que es una especie indomesticada y endémica de los páramos Sudamérica. Se la considera en un estado de fuerte proceso de erosión genética (10). Estudios bromatológicos realizados en Ecuador, indicaron que los frutos contienen importantes cantidades de azúcares, antioxidantes, vitaminas C y B, y minerales como calcio, potasio y fósforo y un gran contenido de antocianinas (8).

Gran cantidad de estudios han reportado importantes usos médicos tales como la mejora en pacientes con Alzheimer por ingesta de extracto de blueberry (11), entre otros. Por otra parte, estudios realizados en la sierra ecuatoriana encontraron que las condiciones ambientales eran apropiadas para su producción, sin embargo, existen aún muchas interrogantes sobre la micropropagación que garantice la asepsia de las plantas que luego serán sembradas en distintas parcelas (12). A estas interrogantes se le suma el desconocimiento que existe sobre las propiedades que pueden poseer los compuestos bioactivos de las hojas, ya que sería otra fuente viable para la elaboración de productos industriales farmacéuticos y alimenticios.

Hasta el momento, la identificación de la especie sólo se la ha hecho de manera taxonómica, sin haber realizado una identificación molecular, excepto por un estudio hecho por Cobos

et. al., 2016, donde secuenciaron la región *matK* de plantas del género *Vaccinium* que habitan en distintas partes del planeta, e identificaron a *V. floribundum* K. argumentando de manera muy general que es una especie que habita en la región de los Andes (13). Las hipótesis de este trabajo son las siguientes: Sus hojas como sus frutos, son grandes fuentes de compuestos nutraceuticos; los extractos de frutas y hojas poseen actividad antimicrobiana; tiene variabilidad genética; El método desarrollado en la micropropagación es una técnica viable para obtener las fases de necesarias en cultivo de tejidos.

El objetivo del presente estudio es caracterizar polifenoles totales, capacidad antioxidante, actividad antimicrobiana de hojas y frutos, su genética y elaborar una metodología de propagación *in vitro*.

El interés de realizar este trabajo radica en valorizar las diferentes actividades de sus compuestos que, en paralelo con el desarrollo de una sistemática viable para propagar *in vitro* a esta especie considerada recalcitrante, brinda una garantía a los agrónomos para que puedan obtener plantas sanas, libres de patógenos, homogéneas y altamente productivas (14). Por lo tanto, la ejecución de este trabajo dará pie a futuras investigaciones que ayuden a salvaguardar al mortiño ecuatoriano de la erosión genética que sufre actualmente y de una posible extinción (9). De manera implícita, también se podría reducir la erosión que están sufriendo los páramos, y por consiguiente ayudaría también a la captación eficiente de las aguas en algunas lugares de la serranía, en especial de ciudades importantes como Quito y Cuenca (12). Con la publicación de los resultados se dará a conocer sus bondades nutricionales, motivando a los agrónomos a cultivar el mortiño, colaborando a la vez con la industria farmacéutica y alimenticia.

1.2 Objetivo general

Caracterizar química, biológica y genéticamente las partes aéreas del *V. floribundum* y desarrollar una metodología de propagación *in vitro*.

1.3 Objetivos específicos

- Caracterizar la capacidad antioxidante y polifenoles totales que poseen tanto los frutos como las hojas del mortiño ecuatoriano.
- Determinar la actividad antimicrobiana a los extractos de fruta y hojas.
- Identificar molecularmente al *Vaccinium floribundum* y caracterizar su variabilidad genética.
- Desarrollar una metodología de propagación *in vitro* de la especie.

2. Marco Teórico

2.1 *Caracterización química*

Entre los compuestos activos tanto en bayas como en las hojas del mortiño, uno de los más importantes y estudiados han sido los polifenoles. Estas moléculas fueron clasificadas dentro de un grupo de sustancias químicas que poseen capacidad antioxidante, y se distinguen por poseer en cada molécula más de un grupo fenol. Generalmente se subdividen en taninos, responsables de la astringencia de algunas frutas; y en flavonoides, responsables del amargor y del color rojo, por ejemplo los antocianos (15).

Las antocianinas que se detectan en la región visible del espectro de luz, son pigmentos hidrosolubles. Son varias las funciones que poseen las antocianinas como: la atracción de polinizadores para dispersar semillas; para proteger a la planta contra los efectos dañinos de la radiación UV; y también de la contaminación microbiana y viral (16). Además de su potencial como ingredientes alimenticios y su impacto positivo sobre la salud humana (17). Los colores rojo, morado y azul en las frutas y en algunos vegetales proporcionados por las antocianinas polares, se debe al desplazamiento de la longitud de onda que genera su catión flavilio, siendo de esta manera más fáciles de determinar mediante el HPLC (18).

Dentro del grupo de los biocompuestos más importantes, se encuentra un ácido de azúcar o el ácido ascórbico reconocido por sus propiedades antioxidantes y de carácter hidrosoluble, cuyos cristales son de color blanco-amarillento. Este enantiómero L- se lo conoce comúnmente como vitamina C (19). Se lo considera un depurador eficaz de radicales por interactuar con las especies de oxígeno reactivo (ROS) (18).

La actividad antioxidante se fundamenta en la capacidad para secuestrar radicales libres. En las últimas décadas los polifenoles de distintos orígenes, han sido sometidos a numerosas investigaciones, ya que neutralizan a los radicales libres y otros beneficios para la salud humana. Muchos de ellos también han sido implicados en la protección contra enfermedades como el cáncer y patologías cardiovasculares, mientras que algunos presentan un mecanismo de protección con potencial contra la enfermedad de Alzheimer (5).

2.2 *Caracterización biológica*

Entre las capacidades de ciertos biocompuestos destaca la actividad antimicrobiana, cuya acción se basa en ciertos mecanismos que inhiben el crecimiento bacteriano, como la permeabilización o desestabilización de la membrana celular, el bloqueo de las enzimas extracelulares de los microorganismos, la influencia sobre el metabolismo privándole de los sustratos indispensables para el crecimiento bacteriano, entre otros. La actividad antimicrobiana de las bayas del mortiño posiblemente esté relacionada con la

antiadherencia de las bacterias a las células epiteliales, requisito previo para la colonización y la infección en patógenos (20).

El método de difusión en pozo se encuentra estandarizado y es en este momento el más recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS de EEUU (30). Se fundamenta en determinar cuantitativa o cualitativamente, el efecto de un conjunto de extractos de manera individual sobre determinados aislados bacterianos, para este último, se calcula la correlación entre la concentración del extracto que necesita para inhibir un aislado bacteriano con respecto al halo inhibitorio del crecimiento que produce dicha sustancia (7).

2.3 Caracterización genética

Es muy importante investigar sobre diversidad genética básica, puesto que nos proporciona una preliminar evaluación sobre estado en que se encuentra conservada la especie, y dado que el mortiño es considerado un valioso recurso natural, es importante su análisis. Esta información puede orientar el desarrollo de colecciones de germoplasma que puedan ser utilizadas para la investigación agronómica, el establecimiento de programas de mejoramiento comercial y la preservación (*in-situ* o *ex-situ*) de esta especie ante el cambio climático y sus efectos perjudiciales sobre los hábitats frágiles, entre otros (13).

Existen muy pocos estudios que han analizado el alcance de la diversidad genética del *V. floribundum*. En consecuencia de ello, las herramientas moleculares dedicadas al análisis genético para esta especie aún no se han desarrollado (13).

Una de las regiones candidata para su secuenciación y posterior análisis en este estudio fue el gen plastidial matK, dado que es una región prometedora para las reconstrucciones filogenéticas entre plantas terrestres divergentes, que ya se ha utilizado con éxito entre varios linajes de angiospermas (21)

Las regiones del ADN de cloroplasto como matK y rbcL, son genes codificantes de proteínas (22). La región matK exhibe una característica excepcional al mostrar una distribución casi igual de las sustituciones de nucleótidos de la primera, segunda y tercera posición del codón. Así, el gen matK evoluciona más rápidamente en contraste con otros genes plastídicos, a pesar de las restricciones transcripcionales y funcionales subyacentes (21).

2.4 Desarrollo de un método de micropropagación

La micropropagación, también conocida como clonación, es definida como la reproducción de una planta a partir de un tejido, una célula o un órgano (raíces, tallos, ramas, hojas). A esto se lo domina totipotencia, o sea, que puede dar origen a otro individuo con iguales características, puesto que, las células de los tejidos vegetales guardan el potencial de reproducirse, y de diferenciarse dando inicio a raíces y tallos. Estos conjuntos celulares constituyen parte de los meristemos primarios y secundarios están presentes en todos los órganos vegetales (23).

Se conoce que, la propagación vegetativa no tiene mucho éxito, en especial cuando se tratan de plantas leñosas, debido a que son muy difíciles de clonar puesto que, tienen una capacidad regenerativa relativamente lenta. Las leñosas o semileñosas como es el caso del mortiño (recalcitrante) han presentado mayores dificultades por su condición estructural que se encuentra limitada por el crecimiento temporal (24).

Los métodos de propagación del cultivo de tejidos se utilizan como un procedimiento adecuado para la producción vegetal eficiente, como la obtención de plantas libres de patógenos (25). De esta manera, se logra establecer plantaciones comerciales de los distintos cultivares, certificados como libres de patógenos. Como se mencionó anteriormente, los patógenos microbianos pueden ser transferidos durante la propagación vegetativa de las plantas. Estas limitantes pueden ser superadas con el uso de técnicas *in vitro*, garantizando un abastecimiento fiable de material de siembra sano (26). Además, se considera a la reproducción sexual con bastante variabilidad genética, por lo que se imposibilita la permanencia de características ideales de una generación a otra (23).

Según Vásquez et al., 1997, la micropropagación permite la producción a gran escala de plantas madres, libres de agentes patógenos; este método está siendo aplicado principalmente en cultivos de plátano, banano, cítricos, piña, plantas ornamentales, a especies forestales como el eucalipto, palma de aceite, entre otras (23), también ha adquirido gran interés para su aplicación en la conservación de especies en peligro de extinción o amenazadas como está ocurriendo actualmente con el mortiño (27).

Con esto, se puede lograr lo siguiente: Valorar genéticamente el material vegetal, comprender las interacciones genotipo-ambiente, preservar genotipos en bancos clonales, reducir los ciclos reproductivos y apresurar las técnicas de cruzamiento; así como, almacenar para la conservación de los genotipos superiores que poseen características fenotípicas favorables (rápido crecimiento, resistencia a las plagas, mayor productibilidad, frutos de calidad, tolerancia a ambientes extremos, etc.) (28).

El normal desarrollo de un arbusto depende mayormente de la interacción entre elementos externos (nutrientes, luz, temperatura, agua) e internos como las fitohormonas que son sintetizadas en un lugar determinado de la planta y que se desplazan a un determinado sitio de acción para regular el crecimiento, desarrollo, reproducción etc. Se han descrito cinco grupos importantes de hormonas reguladores de crecimiento (auxinas, giberelinas, el ácido abscísico, citoquininas y el etileno), cada uno es responsable de un efecto dominante (5).

Existen distintos tipos de auxinas, naturales y sintéticas, se encuentran el ácido naftalacético (ANA), ácido indolacético (AIA), y ácido indolbutírico (AIB, 2,4-D y 2,4,5-T). El AIA es la más conocida y es producida en los meristemos, ápices de los tallos, y hojas jóvenes, migrando para el resto de la planta. Esta hormona inhibe el progreso de brotes axilares laterales por toda la longitud del tallo, conservando la dominancia apical. Por ello, es necesario establecer la concentración oportuna de auxinas para especies silvestres (29).

Las citoquininas más conocidas son: kinetina, zeatina y benzilaminopurina (BAP). Proceden en las zonas de crecimiento, como al final de la raíz y llevada por vía acropétala (de abajo hacia arriba), de esta manera estimula la división de las células en tejidos que no son meristemáticos. Su intervención es positiva cuando interactúa con las auxinas en la dediferenciación y división celular. Por lo tanto, es significativo realizar un proporción equilibrada de auxinas:citoquininas (30).

Todo este conocimiento debe ser revisado si se desea aplicar métodos de micropropagación a especies silvestres, con la finalidad de recrear en el laboratorio lo más cercano a lo que ocurre en su ambiente natural (31), para obtener una reproducción homogénea e idéntica a la planta madre y que esta a la vez, posea características deseables (alta productividad, calidad y tolerancia al estrés) (31).

En este contexto los estudios para el establecimiento *in vitro* de ciertos cultivares se fundamenta principalmente por su necesidad ecológica, alimenticia o por su dificultad para su propagación en términos convencionales, en este caso al mortiño se lo categoriza como idóneo, ya que se encuentra dentro de estos tres escenarios. Un sinnúmero de investigadores, recomiendan que los estudios de micro-propagación, se deben estandarizar para cada una de las etapas, como la desinfección, restablecimiento, enraizamiento mediante la aplicación de varias estrategias como recomienda el trabajo de Torres *et. al.*, 2010 (27), donde logró obtener una homogenización en los resultados de brotación sin alterar genéticamente la prole durante la experimentación, en pocas palabras, que no presenten alteraciones fenotípicas que puedan alterar la producción de polifenoles (23,29).

3. Metodología

Para llevar a cabo este trabajo de investigación se siguió el siguiente esquema:

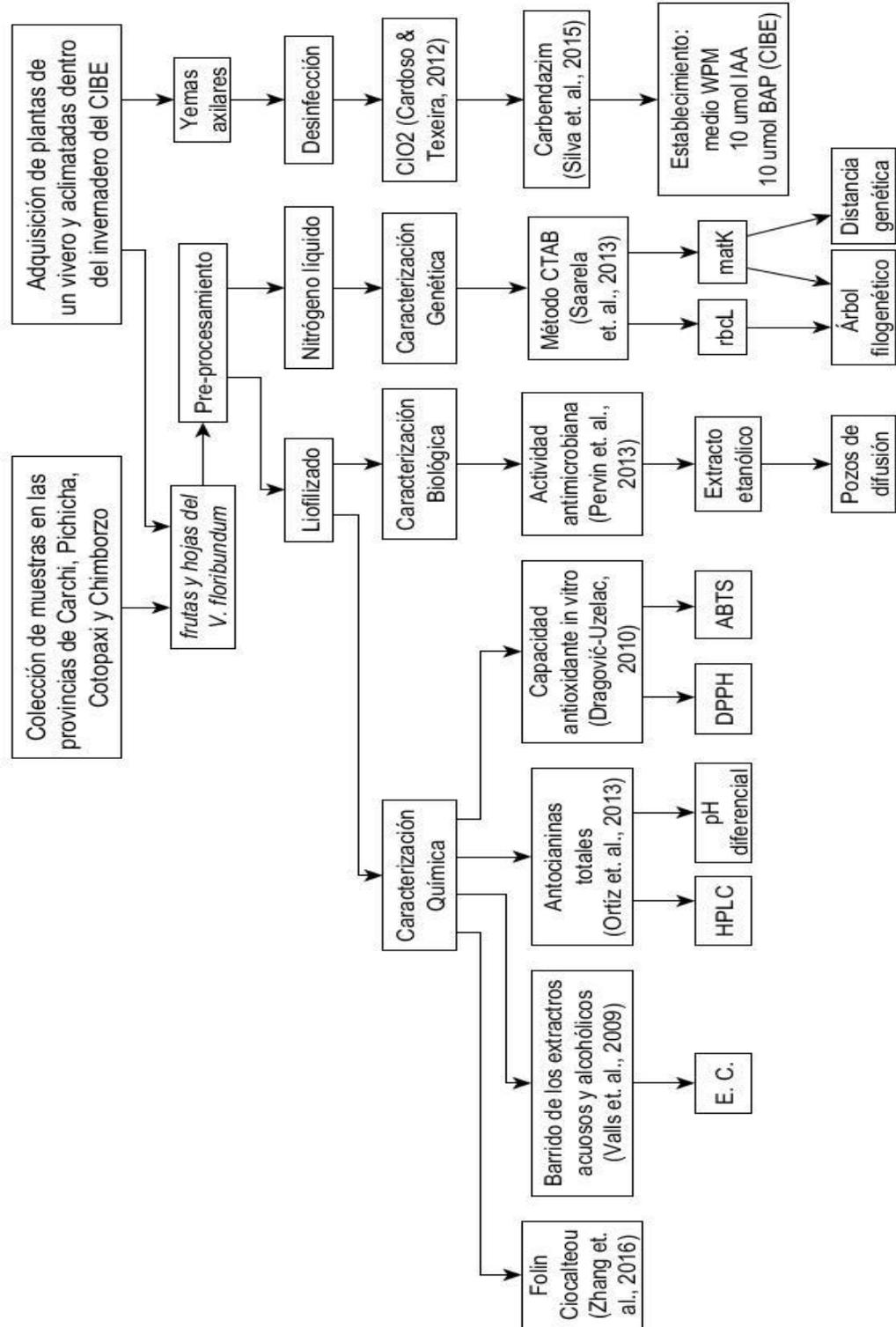


Gráfico 1. Esquema de trabajo

3.1 Colección y preparación de las muestras

Se colectaron muestras obtenidas de plantas silvestres de aproximadamente 1.5 metros de altura ubicadas en las zonas altoandinas de las Provincias de Carchi, Pichincha, Cotopaxi y Chimborazo. También se adquirieron plantas de un vivero situado en el cantón Machachi y que fueron conservadas dentro de un invernadero a 25 °C en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador "CIBE-ESPOL" ubicado en el cantón Guayaquil, estas últimas tenían una altura de 30 a 40 centímetros. Hojas y frutos se lavaron y se descartaron las bayas que se encontraban deterioradas. Luego se liofilizaron las muestras en un equipo LYOVAC modelo GT2 y se pulverizaron.

3.2 Caracterización química

3.2.1 Polifenoles totales con el reactivo Folin-Ciocalteu

Para este ensayo se pesó 0,2 g de muestra liofilizada en un erlenmeyer de 25 mL recubierto con papel aluminio, se añadió 10 mL de una solución de acetona al 70 % v:v. Se llevó a agitación durante 10 min con un magneto a 500 rpm en un plato agitador (marca IKA; modelo RCTBS1; serie 03028601) y se homogenizó la muestra en baño ultrasónico (marca VWR; modelo 97043-970; serie 1125A-0209) a 24 °C por 10 min y se filtró con papel filtro (whatman 41). El extracto filtrado se almacenó en frascos ámbar y fue tratado con dos procedimientos distintos: A y B.

Para la parte A se realizó una dilución del extracto cetónico 1:20. Se utilizó como blanco acetona 70 % v/v disuelta en igual proporción que el extracto (32). La parte B consistió en la exclusión de vitamina C y azúcares reductores de los polifenoles mediante cartuchos de separación (marca: Waters Oasis HLB) con el propósito de eliminar la interferencia de estos en la cuantificación de los polifenoles. En este procedimiento se diluyó el extracto cetónico a una proporción a 1:8 y se completó a 4 mL. Se depositó 2 mL de esta solución en el cartucho OASIS (acondicionado anticipadamente), el volumen se recogió en una probeta y se lavó con 2 mL de agua destilada para recobrar la vitamina C y azúcares. Se recogió el filtrado en la misma probeta y se anotó el volumen total recogido. De este filtrado se tomó un alícuota de 500 µL, y se utilizó como blanco 500 µL de agua destilada. Tanto al método A como el B se les aplicó el protocolo del Folin-Ciocalteou, y se prosiguió a la lectura de la absorbancia usando el espectrofotómetro (GENESYS™) a 760 nm.

Es relevante conocer que, a partir de este ítem, los extractos cetónicos, los estándares (diluciones de ácido gálico), el blanco, y los filtrados, recibieron igual procesamiento indicado para el ensayo del Folin-Ciocalteou descrito a continuación.

Se extrajo una alícuota de 500 µL de solución filtrada y se la vertió en un tubo de ensayo. Se le agregó 2.5 mL de solución de Folin 2 N y se homogenizó en el vortex (marca Boeco, modelo V1 PLUS) y se dejó reposar durante 2 min a 25 °C. Se modificó el pH añadiendo 2 mL

de solución de carbonato de sodio, y se homogenizó en vortex seguido de un baño de agua a 50 °C durante 15 min. Se enfrió de manera inmediata el tubo en un baño a 4 °C para detener la reacción. Desde este punto, se tuvo hasta 30 min para efectuar la lectura. Se procedió a leer la absorbancia de cada tubo a 760 nm en el espectrofotómetro (GENESYS), y se enceró el equipo con su blanco respectivo (agua destilada) (33).

Para realizar la curva de calibración se utilizó ácido gálico como estándar y se preparó una solución madre (500 ppm) pesando 25 mg de ácido gálico, disolviéndolo con 3 gotitas de metanol y se aforó en 50 mL con agua destilada. Se obtuvo la curva de calibración al diluir en un rango de concentraciones de la solución madre entre 10 – 100 ppm. De cada solución se tomó 500 µL, se utilizó como blanco 500 µL de agua destilada y se prosiguió el procedimiento del Folin-Ciocalteou explicado anteriormente.

Se graficó la concentración vs la absorbancia de todos los estándares, para obtener la curva de calibración. Con la regresión lineal se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras y se obtuvo la concentración.

Regresión lineal $y = mx + b$

Y= absorbancia de los estándares

X= concentración (mg/l de ácido gálico)

B= intercepto en el eje Y

Donde:

$$Cn A = (y - b) / m * fd + V/P$$

$$Cn B = (y - b) / m * fd + V/P$$

Entonces:

$$Cn = CnA - CnB$$

Cn= concentración de polifenoles totales como equivalente de ácido gálico (mg/g de muestra)

Fd= factor de dilución

V= volumen extractante (l)

P= peso de la muestra (g)

3.2.2 *Barrido de los extractos alcohólicos y acuosos*

Para conocer los distintos compuestos que poseen las partes aéreas del mortiño, se realizó un barrido de los extractos acuosos de sus hojas y frutos por electroforesis capilar (marca: Agilent Technologies, modelo 7100) a las siguientes condiciones: Los extractos acuosos se los diluyó en proporción 1:20. Buffer: borato de potasio a 50 mmol y pH de 10,17. Capilar sílica fundida 27 cm x 50 mm a 25 °C, corriente de 300 µA, 30 KV; 5 seg inj (x presión 0,6 nL/seg) (34,35).

3.2.3 *Determinación de antocianinas totales*

La presencia de antocianinas se determinó mediante dos métodos: cromatografía líquida de alta resolución HPLC (Perkin Elmer-EEUU) y pH diferencial. El primero se comparó el tiempo de retención de los picos obtenidos de las muestras con los registrados en la literatura (36). La identificación de antocianinas se realizó bajo las siguientes condiciones: Columna: C18, 15 μm (4,6 x 250 mm); Eluente A: 9 % CH₃CN, 10 % Ac. Fórmico, B: 36 % CH₃CN, 10 % Ac. Fórmico con gradiente: 0,5 - 2,5 min, 100 % A: 2,5 – 30 min, 71,5 % B: 30 – 40 min, 71,5 % B; T°: 30 °C; Tasa de flujo: 1,0 mL/min; Detección: absorbancia, vis a 540 nm; Volumen de inyección: 5 μL (37).

En el segundo método conocido como “pH Diferencial” basado en la colorimetría (5), se prepararon las siguientes soluciones: Buffer pH = 1,0: Donde se disolvió 7,45 g de cloruro de potasio en 0,5 L de agua destilada (solución A); HCl (0,2 N): se Diluyó 8,29 mL de ácido clorhídrico concentrado en 0,5 L de agua destilada (solución B). Una vez listo los buffers, se agregó la solución (B) a la solución (A) lentamente, midiendo el pH en cada momento y ajustándolo a 1,0 con la solución (B).

El siguiente Buffer con pH de 4,5: se disolvió 68 g de acetato de sodio en 0,5 L de agua destilada (solución C); HCl: y se diluyó 41,45 mL de ácido clorhídrico (1 N) concentrado en 0,5 L de agua destilada (D). Finalmente se agregó la solución (D) a la solución (C) lentamente, midiendo el pH y ajustándolo a 4,5 con la solución (D).

Luego se procedió a preparar los extractos, pesando 1,5 g de muestra liofilizada por duplicado y rotulándolas como m1 y m2. Se trasvasó la muestra con 50 mL de buffer (dos muestras con buffer de pH = 1,0 y las otros dos con buffer de pH = 4,5), se mezcló en una licuadora a alta velocidad por 5 minutos. Se centrifugó y se filtró hasta alcanzar una solución clara y sin sedimento. Se efectuó una dilución para que la absorbancia de la solución con pH 1,0 se encuentre en el rango de 0,3 a 0,7 UA a 510 nm. Se procedió a encerar el equipo con buffer del pH de su correspondencia. Las soluciones fueron leídas en el espectrofotómetro a dos longitudes de onda, a 510 nm y luego a 700 nm.

A continuación, a cada una las muestras líquidas se le extrajo 4 mL de muestra y se las colocó en 4 tubos de ensayo, dos para m1 y dos para m2. Se les agregó 1 mL de buffer (dos muestras con buffer de pH 1,0 y dos con buffer de pH 4,5) de tal forma que el volumen final fue de 5 mL. Se agitó con ayuda del vortex (Marca Boeco, modelo V1 PLUS) durante 1 minuto a cada tubo. Las soluciones fueron leídas en el espectrofotómetro a las mismas longitudes de ondas mencionadas en el párrafo anterior.

Se procedió al cálculo de la concentración en mg de antocianinas por gramo de muestra:

$$C_n = \left(\frac{(A_1 - A_2) * V_1 * f d_1}{m_1} - \frac{(A_1 - A_2) * V_1 * f d_1}{m_1} \right) * \frac{PM * 1000}{\epsilon}$$

C_n = Concentración de antocianinas mg/g (muestra sólida) /mg/mL (muestra líquida);

A₁ = Absorbancia media a 510 nm, buffer pH 1 y m₁

A2 = Absorbancia media a 700 nm, buffer pH 1 y m1
 A3 = Absorbancia media a 510 nm, buffer pH 4,5 y m1
 A4 = Absorbancia media a 700 nm, buffer pH 4,5
 m1 y m2 = masa de muestra (sólida)/volumen de muestra (líquida)
 V1 y V2 = volumen de la alícuota de cada buffer pH = 1 y pH = 4,5 respectivamente
 fd1 y fd2 = Factor de dilución para cada muestra de buffer pH 1 y 4,5 respectivamente
 Absorbancia molar de antocianina mayoritaria (PM = 449,2 g/mol, ϵ 1 = 26900 L/mol.cm
 PM = Peso molecular de la antocianina (cianidin-3-glucosida) en la fruta

Su medición se la realizó en el espectrofotómetro (GENESYS™).

3.2.4 Capacidad antioxidante *in vitro*

Para establecer la capacidad antioxidante de las hojas y fruta del mortiño se utilizaron dos métodos: DPPH y ABTS.

Para el ensayo con DPPH se pesó 10 gr de muestra liofilizada y se añadió 100 mL de etanol. Se pasó al baño de ultrasonido durante 30 minutos. El sobrenadante se filtró con papel Whatman No 1. Se removió el solvente a 40 °C usando un rotoevaporador. Se prosiguió a elaborar la solución de DPPH al 0.004 % (p/v). En el cual, se pesó 4 mg de 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl, se aforó a 100 mL con etanol y se prepararon las diluciones para cada muestra Tabla 1 (38).

Concentración de la muestra madre 30000 ppm.

Tabla 1. Preparación de diluciones a partir del extracto de hoja

Volumen muestra madre	Volumen de etanol	Volumen final (DPPH)	Concentración final
1000 μ L	1000 μ L		2515 ppm
800 μ L	1200 μ L		2012 ppm
600 μ L	1400 μ L	2000 μ L	1509 ppm
300 μ L	1700 μ L		754 ppm
100 μ L	1900 μ L		251 ppm

Un total de 3,2 mL de EtOH, más 200 μ L de cada solución de muestra se utilizaron como blanco. Y 3,2 mL de DPPH al 0,004 % (peso/vol) más 200 μ L de EtOH como control negativo. Se añadió 200 μ L de las diferentes concentraciones de la muestra de ensayo a 3,2 mL de solución de DPPH al 0,004 % (peso/vol). Después de 30 min de reacción, se determinó la absorbancia a 517 nm, y se calculó el CI_{50} (Concentración inhibitoria de DPPH).

El siguiente ensayo fue la determinación de la capacidad antioxidante equivalente al trolox o ABTS: donde se pesó 96 mg de ácido 3,4 - dihidro - 6 - hidroxil - 2,5,7,8 - tetrametil - 2H - 1 - benzopirano - 2 - carboxílico en un vaso de precipitación y 16 mg de peróxido disulfato de

potasio en otro vaso. A cada uno se le colocó gotas de agua destilada hasta que se disolvieran. Cabe señalar que dichos reactivos fueron preparados un día antes de realizar los ensayos. A continuación, en un matraz de 25 mL se colocó el ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3 - etilbenzotiazolina - 6 - sulfónico) y luego el peróxido disulfato de potasio y se lo aforó a 25 mL con agua destilada. Se finalizó esta etapa cubriendo el matraz con papel aluminio y dejándolo reposar durante la noche (38).

Al siguiente día se prepararon las muestras, cuyo procesamiento es el mismo que para polifenoles mencionado en la sección 3.2. El estándar TROLOX se lo preparó en un matraz de 25 mL en donde se pesó 15,64 mg de TROLOX y fue aforado a 25 mL con etanol. Luego se prepararon las soluciones con el estándar a las siguientes concentraciones:

125 μ L de estándar al 12,5 % + 875 μ L de etanol
 250 μ L al 25 % de estándar + 750 μ L de etanol
 500 μ L al 50 % de estándar + 500 μ L de etanol
 750 μ L al 75 % de estándar + 250 μ L de etanol
 1000 μ L al 100 % de estándar

La solución con reactivo radical se lo preparó en un erlenmeyer, donde se colocó 1 mL de reactivo preparado el día anterior y se aforó hasta 100 mL con etanol (se homogenizó). Se cubrió el erlenmeyer con papel aluminio y se lo colocó en baño termostático 20 °C.

Se procedió a nivelar el reactivo para que se encuentre dentro del rango de absorbancia 680 a 720 nm y después se midieron los estándares para la curva de calibración en un espectrofotómetro (GENESYS™). La absorbancia de la muestra procesada se midió en los mismos rangos de longitud de onda.

Los datos se sometieron al siguiente cálculo:

$$Cn = \frac{\frac{\%I - b}{m} * V * fd}{P}$$

3.3 *Caracterización biológica*

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las partes aéreas del mortiño, se procedió a realizar el extracto etanólico (70 %) de la siguiente manera: se colocó 500 g de muestra liofilizada en 100 mL de solvente en un matraz, se lo dejó macerar por una hora y se procedió a filtrar en papel whatman. Después se midió la concentración de soluto de los extractos de fruta y hoja, colocando 1 mL de cada uno, en capsulas de porcelana previamente pesadas en una balanza analítica (Mettler Toledo, modelo AB204-5), se los puso en una estufa (Quimis, modelo Q31711-23) a 105 °C hasta que alcanzaron un peso constante (en aproximadamente 3 horas), después se volvieron a pesar y se anotó la diferencia, dando este ensayo como resultado 0,6988 g/mL y 0,2365 g/mL de soluto de extracto de fruta y hoja respectivamente.

Previo al experimento, se efectuó el crecimiento de las bacterias 24 horas antes del ensayo en una incubadora a 37 °C. Es importante indicar que, estos patógenos pertenecen al banco de cepas del CIBE, los mismos que han sido certificados mediante identificación molecular en la región 16s de su material genético. Posteriormente, se tomaron los inóculos de cultivo, los mismos que ya se encontraban en fase exponencial de crecimiento y así, se evitó seleccionar variantes atípicas (6). Los medios de cultivo requeridos para esta técnica fueron el agar tripticosa soya (TSB) y Luria Bertani agar (LB) (39). Se utilizaron ocho cepas Gram negativas: *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Salmonella Typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y tres Gram positivas: *Probionibacterium propionicum*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, cuya procedencia fue el banco de cepas del Centro de Investigación Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), a una concentración de 0.5 en la escala Mac Farland (7).

Seguido de ese tiempo, se tomó de la placa una colonia bacteriana con un asa de platino y se lo mezcló con agua destilada al 0.8 % de salinidad, se dio vortex al tubo de ensayo para luego ser medido a 0.5 Mac Farland, inmediatamente se vertió 100 µL de dicha solución sobre la caja petri, se lo dispersó por toda la superficie del agar, y se dejó reposar por 5 min, a continuación se efectuaron 4 pozos de 3 mm de diámetro con un sacabocados, se vertió en cada pozo 50 µL de los distintos tratamientos (extracto de hoja, de fruta y controles (+) y (-) con tres réplicas. Se los dejó incubar por 24 horas y se procedió a medir el radio del halo. Se utilizó ampicilina como control (+).

3.4 Caracterización genética

La extracción de ADN se la realizó aplicando el protocolo conocido como CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (40), este reactivo es una sal de amonio cuaternario, empleado como detergente para facilitar la extracción de ácidos nucleicos (41). Este método consistió en tomar 120 mg de tejido pulverizado por congelación con nitrógeno líquido (Marca Retsch; Modelo MM 400), y se le adicionó 800 µL de buffer de extracción a cada muestra, se los mezcló en un vortex (Marca Boeco, modelo V1 PLUS) con 15 µL proteinasa K (20 µg/ µL) y fueron colocados a baño María (65 °C) durante una hora, invirtiendo los tubos cada 10 minutos.

Luego, los tubos fueron retirados del baño María y se los dejó enfriar a temperatura ambiente, se les adicionó 700 µL de cloroformo - isoamil (24:1), y se agitaron por inversión hasta que se tornaron turbios, se los centrifugó a 4 °C (marca: Thermo Fisher; Modelo: Heraeus™ Multifuge™ X1) por 10 minutos a 14.000 rpm, se les retiró el sobrenadante y el restante fue colocado en tubos nuevos de 2 mL. Después, se le adicionó ARNasa a una concentración de 40 µg/mL e incubaron por 15 minutos a 37 °C. Se volvió a añadir un volumen de cloroformo-isoamil (24:1) y se los agitó por inversión, se los centrifugó nuevamente a 4 °C por 10 minutos a 14.000 rpm, y se retiró el sobrenadante para colocarlos nuevamente en tubos eppendorf nuevos de 1.5 mL. Se les adicionó de inmediato un volumen de isopropanol frío, se mezcló invirtiendo los tubos por 5 minutos, y se los dejó a -20 °C durante media hora. Inmediatamente, se los centrifugó bajo las mismas condiciones,

se les removió el sobrenadante y se lavó 2 veces el pellet con 200 μ L de etanol al 70 %, se los volvió a centrifugar de igual forma.

Después de un reposo a temperatura ambiente por 20 minutos, finalmente, se logró resuspender el ADN en 50 μ L de agua ultra pura, se purificó el material genético y se realizó una PCR para amplificar regiones conservadas dentro del genoma de la planta usando los siguientes iniciadores (matK_3f_KIM f CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG matK_1r_KIM r ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC) y rbcL (rbcL_F ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC rbcL_R GTAAAATCAAGTCCACCRG) (1 μ L de cada primer 100um), GoTaq marca Promega 2X, 2ul de ADN (13ng/ul) se completó con agua ultrapura para un volumen final de 10ul (42).

El programa para PCR fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C por un minuto, luego se llevó a cabo el ciclo de desnaturalización a 95 °C, anillamiento a 50 °C y extensión a 72 °C (35 ciclos), y una extensión final a 72 °C por 1 minuto (13). Se utilizó el termociclador (Marca Eppendorf, Modelo Mastercycler nexus Family), una vez listo el producto de PCR, fue enviado para su respectiva secuenciación. Las secuencias fueron comparadas con las que se encuentran registradas en la base de datos del NCBI. Se utilizó el software GENEIOUS para realizar el árbol filogenético y el software MEGA 6 para calcular la distancia mediante neighbor-joining en Compute Pairwise Distance, el alineamiento con Muscle y 1000 bootstraps (28).

3.5 *Micropropagación*

El material vegetal fue introducido y establecido *in vitro* de acuerdo a los protocolos establecidos en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales perteneciente al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL).

Los esquejes fueron obtenidos de brotes de yemas axilares de plantas que se encontraban en cautiverio dentro del invernadero del CIBE, con un tamaño entre los 3 a 5 cm de longitud. Para librar a los esquejes de patógenos, se ideó una serie de estrategias, y para cual, se realizó un diseño factorial 2 X 3 X 3 para la desinfección con ClO₂ y otro de 2 X 3 X 2 para la desinfección con el fungicida carbendazim.

Primeramente, las estacas fueron lavadas en un flujo continuo de agua potable y detergente neutro, luego se colocaron 2 esquejes en cada vaso de precipitación, los cuales contenían agua destilada con dióxido de cloro al 2 %, y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10, 20 y 30 minutos respectivamente (3 réplicas) (24). Después, se sumergieron por un minuto en etanol al 70 %, y fueron sumergidos de inmediato en hipoclorito al 2 % durante 7 minutos, seguido de cuatro lavados con agua destilada estéril (43).

Para el siguiente paso, las estacas previamente desinfectadas con el ClO₂, fueron colocadas en frascos estériles con los medios MS con 0.2, 0.5, y 1.0 % de carbendazim (bencimidazol 2-il carbamato de metilo) (44), al 2 y al 1 % de fitagel (sólido y semisólido respectivamente) a

20 °C y fotoperiodo de 12 horas/luz por 2 semanas (25). La desinfección fue medida como presencia o ausencia del patógeno. Una vez obtenido el método estratégico de desinfección, se prosiguió con el desarrollo la técnica a continuación.

Para el establecimiento y multiplicación del cultivo, se propuso un protocolo señalado por los técnicos del laboratorio de cultivo del CIBE y por mi persona. Los explantes fueron colocados en un medio de cultivo sólido WPM (Woody Plant Medium) modificado y suplementado con 0,1, 1,0 y 10, μmol de BAP (6-Bencilaminopurina) y 0,1, 1,0 y 10 μmol de IAA (ácido Indolacético) (3 réplicas), El pH de los medios fue ajustado a 5,9 y los parámetros de esterilización en el autoclave (Marca: Market Forge; Modelo: STM-EL) fueron de 121 °C y presión de 1,05 kg/cm^2 por 20 minutos .

3.6 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. Se aplicó el análisis de diferencia significativa propuesto por Tukey mediante el programa Minitab 16. Los resultados de DPPH se expresaron como CI_{50} .

Los datos obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana, se los analizó con Tukey utilizando el programa R versión 3.3.3, con nivel de significación de $p < 0,05$. El análisis de correspondencia se llevó a cabo utilizando Infostat (versión 20161) para determinar las correlaciones potenciales entre el tipo de bacteria (Gram (+) y Gram (-)), el potencial grado de resistencia a antibióticos y el halo de inhibición. Los datos de los radios de los halos de inhibición se dividieron en cuartiles, para obtener los rangos bajo, medio bajo, medio-alto y alto. Los patógenos bacterianos probados se clasificaron en Gram (+) o Gram (-) así como potencialmente bajos, medios, altos o críticos resistentes a los antibióticos según la OMS (45).

4. Resultados

4.1 Caracterización química

El método Folin-Ciocalteu es un mecanismo de oxidación/reducción, y que mide la capacidad para reducir al ácido fosfomolibdico/fosfotungstico a un complejo azul y se lo utiliza para estimar la cantidad de polifenoles de cada muestra (38). La primera prueba se utilizó para determinar si hay factores que influyen en los resultados de la prueba y se observó que las plantas aclimatadas en el invernadero obtuvieron valores de 218.40 y 229.82 $\text{mg EqAG}/100 \text{ g}$, a diferencia de las plantas silvestres con valores de 164.23 y 162.84 $\text{mg EqAG}/100 \text{ g}$ para 38 y 250 μm de tamaño de partícula, respectivamente.

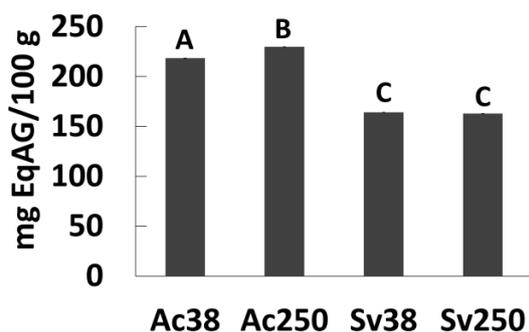


Gráfico 2. Comparación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu de plantas aclimatadas en el invernadero (Ac), silvestres (Sv) y por tamaño de partícula (38 y 250 μ m). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En el segundo ensayo de polifenoles totales se observó que las muestras de Pichincha produjeron concentraciones significativamente mayores de polifenoles (146.10 y 204.01 mg EqAG / 100 g para frutos y hojas, respectivamente), seguido de las hojas de las plantas comerciales (201,19 mg EqAG / 100 g) que las muestras de Chimborazo (107.37 y 144.33 mg EqAG / 100 g para frutos y hojas, respectivamente).

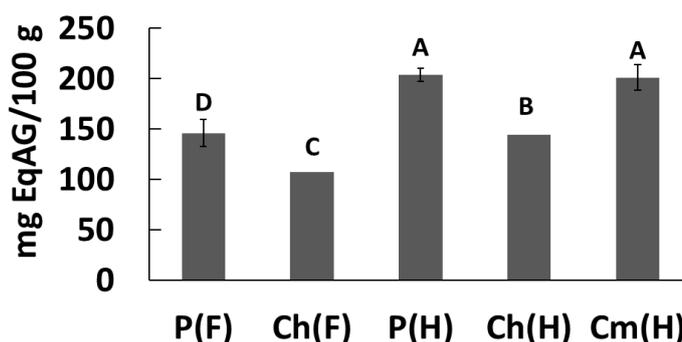


Gráfico 3. Polifenoles totales por Folin-Ciocalteu de frutos y hojas provenientes de Pichincha (P(F), P(H)), de Chimborazo (Ch(F), Ch(H)), y comerciales (Cm(H)). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Como se conoce, la acción antioxidante no puede ser medida de forma directa, pero puede establecerse por los efectos antioxidantes del compuesto en un proceso controlado de oxidación. El CI_{50} del DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) realizado a las hojas de las plantas silvestres (Pichincha y Chimborazo) y las plantas comerciales, demostró una pérdida significativa sobre la capacidad antioxidante en esta última (0.053, 0.018 y 0.296 mg/mL).

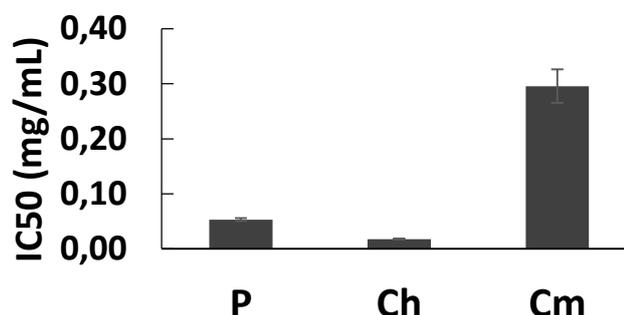


Gráfico 4. Análisis CI50 de DPPH de hojas pulverizadas provenientes de Pichincha (P), Chimborazo (Ch) y comerciales (Cm). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Estudios recomiendan que se debe aplicar más de un método para obtener un valor aproximado de capacidad antioxidante total (46). Partiendo de dicho argumento, se realizó la técnica ABTS, que compara el análisis del método DPPH, sus resultados fueron de 10.81, 11.23 and 10.25 mmolTE/100 g de muestra para plantas de Pichincha, Chimborazo y comerciales respectivamente (36).

Con estos dos métodos (DPPH y ABTS) se evidencia la pérdida en la capacidad antioxidante de las plantas comerciales, infiriendo que se debe a que las plantas comerciales al no encontrarse expuestas a condiciones climáticas adversas, no están generando los metabolitos indispensables para su sobrevivencia en esos ambientes (47), aunque también puede deberse a los distintos mecanismos de acción que poseen estos reactivos (DPPH y ABTS) frente a distintas moléculas antioxidantes (48) como: el potencial redox de los polifenoles, formación de aductos, accesibilidad estérica (accesibilidad al espacio, impedimento causado por la influencia de un grupo funcional de una molécula en el transcurso de una reacción química) o el pH del extracto (48).

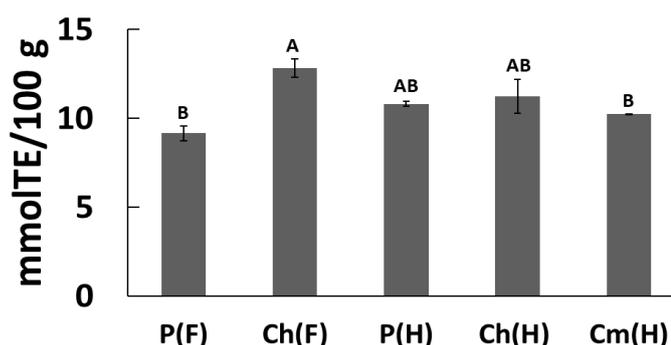


Gráfico 5. Capacidad antioxidante mediante ABTS de frutas y hojas del mortiño, provenientes de la provincia de Pichincha (P(F) y P(H)), del Chimborazo (Ch(F) y Ch(H)) y Comerciales (Cm(H)). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Pese a que, las muestras de plantas que habitan en las localidades de Pichincha, alcanzaron cantidades superiores de polifenoles (204.01 vs. 144.33 mg EqAG/mL muestra) (Gráfico 2) y de antocianinas (1095,39 vs 89,88 mg/100g de muestra) (Gráfico 4) que las muestras de plantas de Chimborazo. Estas últimas, alcanzaron mayor capacidad antioxidante (9.16 vs 12.84 mmolTE/100 g de muestra) (Gráfico 5). Estos resultados contradicen lo señalado por Mertz *et. al.*, 2009 donde indica que, el género *Vaccinium* tiene una fuerte relación entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante (49), pero es similar a lo ocurrido con el estudio de Ruales *et. al.*, 2008, donde curiosamente algunas frutas como la guayaba tenían equivalentes TROLOX comparables al mortiño, aunque su contenido fenólico total sea bajo. Esto indica que estas frutas contienen potentes antioxidantes fenólicos (33).

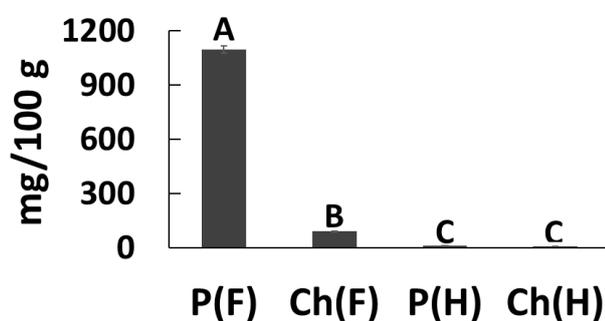


Gráfico 6. Concentración de antocianinas por pH diferencial en frutos y hojas de mortiño, provenientes de Pichincha (P(F) y P(H)), y del Chimborazo (Ch(F) y C(H))

Investigaciones sobre *V. angustifolium* por Goyali *et. al.*, 2013, indicaron que, las hojas de arándano silvestre pueden servir como fuente de metabolitos antioxidantes para la industria nutracéutica por poseer niveles más altos de polifenoles y proantocianidinas (50). Como es el caso del mortiño del Chimborazo a 4800 msnm y cuyas condiciones ambientales son muy adversas como por ejemplo, la ceniza que cae en el suelo de manera constante desde el año 1534, el fuerte viento, y además que, es uno de los volcanes más peligrosos y activos del mundo (51), a diferencia de las plantas de la provincia de Pichincha a 3000 msnm con factores ambientales más tolerables. Esto indica que no solo depende del genotipo, sino también el ambiente (29), y se debe por alguna especialización en los compuestos polifenólicos por estar expuestos a una mayor radiación, frío y altura. Por lo tanto, los presentes resultados reflejan alguna modificación evolutiva que les permite a las plantas soportar dichas condiciones ambientales extremas.

Según Dragović *et. al.*, 2017, existen muchos factores que influyen en el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de los arándanos (52). Varios estudios sugieren que el contenido y la composición de compuestos fenólicos en los arándanos están influenciados mayormente por la ubicación y estación de cultivo que por las etapas de crecimiento. Meriño *et. al.*, 2015 refiere que, el tipo de suelo y factores químicos que influyen en la producción de polifenoles ya sean estos enzimáticos o no, llevan incluso a la toxicidad, por ejemplo, si el pH del suelo es bajo (53).

Los picos del cromatograma de antocianinas obtenidos por el HPLC (high performance liquid chromatography) con absorbancia VIS a 540 nm, cuya comparación con los picos obtenidos en la literatura con la misma absorbancia y condiciones en el programa registrado en el equipo expone que, el extracto de fruta posee algunos tipos de antocianinas, las mismas que comienzan a manifestarse a partir del tiempo de retención del minuto 4 hasta el minuto 6, resultado característico de estos pigmentos hidrosolubles según la bibliografía (37) Tabla II (Gráfico 7).

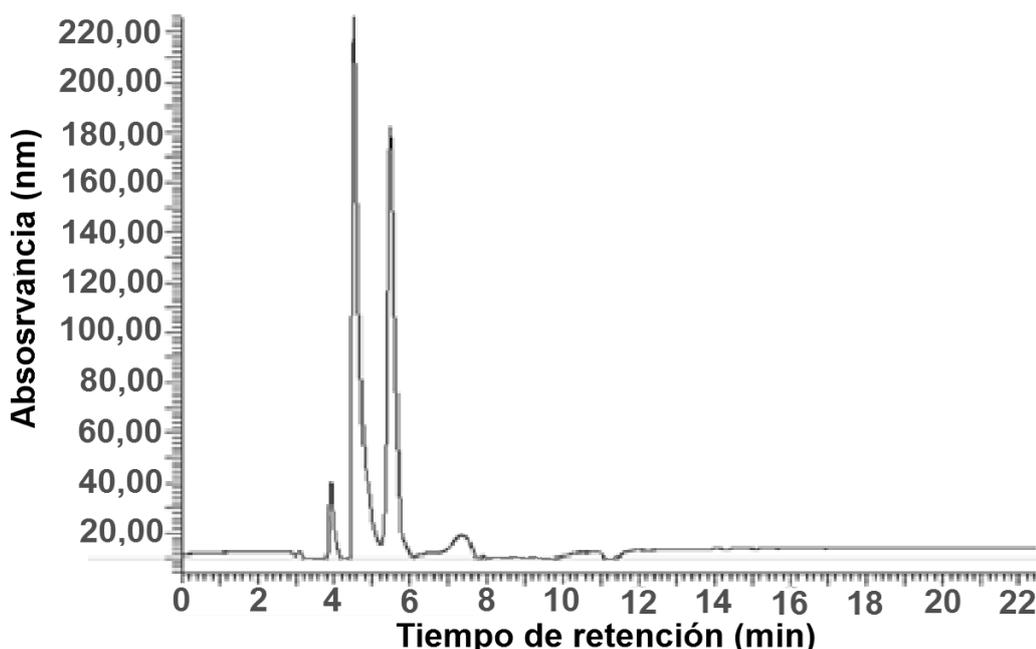


Gráfico 7. Cromatograma de una representativa caracterización de antocianinas por HPLC

Los barridos de los compuestos por electroforesis capilar de los extractos de hoja se detectaron compuestos tales como: un ácido fenólico derivado del ácido benzoico; Un derivado de la naringenina, un derivado del ácido gálico, y cinco compuestos desconocidos (Tabla II). El ácido benzoico es conocido como conservante en la industria alimentaria desde 1875 debido a su actividad antimicrobiana (54), y en una revisión sobre productos naturales con efectos hepatoprotectores, mencionan el gran potencial surgido de los estudios de la naringenina (55) en *V. corymbosum* L., indicaron sus efectos protectores contra la colitis ulcerosa inducida por el ácido acético, mediante la inhibición de bio-marcadores inflamatorios y oxidativos (56,57)

No se logró detectar al ácido ascórbico en los extractos alcohólicos y acuosos del fruto, pero si un ácido fenólico derivado del ácido siríngico y tres compuestos desconocidos. Del *et. al.*, 2016 evidenciaron la capacidad para contrarrestar el proceso inflamatorio del aterosclerosis que poseían las antocianinas y los ácidos fenólicos como el ácido siríngico y gálico de un arándano silvestre (*V. angustifolium*) (47).

Estos resultados se obtuvieron comparando el espectro de los picos con los espectros de los compuestos de la biblioteca. Aunque la literatura ha demostrado la presencia de ácido ascórbico en la fruta, esto no fue detectado en nuestros análisis, posiblemente el método de electroforesis capilar no era adecuado para la medición (58).

Tabla II. Compuestos identificados en frutos y hojas por barrido en Electroforesis Capilar

#	Compuesto	Fruta TM	Hoja TM
1	Ácido fenólico, derivado del Ac benzoico		2,043
2	Algún derivado de la naringenina		2.396
3	Derivado del Ac gálico		3.043
4	Desconocido 1		3.203
5	Desconocido 2		3.296
6	Desconocido 3		3.443
7	Desconocido 4		3.736
8	Desconocido 5		4.123
9	Desconocido 6	2.609	
10	Ácido fenólico derivado del Ácido siríngico	3.409	
11	Desconocido 7	3.589	
	Desconocido 8	4.069	

4.2 Caracterización biológica

Los mecanismos de acción que ejercen ciertos biocompuestos al inhibir el crecimiento bacteriano, da como resultado en los ensayos de actividad antimicrobiana, halos de inhibición. El mayor halo observado en el presente estudio fue de 19,83 mm de radio y resultó de probar el extracto de fruta contra el *V. vulnificus*, seguido de *V harveyi* con 16,33 mm y *E. coli* 15,17 mm con extracto de fruta en medio TSA, (Gráfico 9). Cabe destacar que, la cepa *P. aeruginosa* (naturalmente multirresistente) sólo produjo halo frente al extracto de fruta con un radio de 6,33 y 7,33 mm en TSA y LB respectivamente (Gráfico 9 y 10) y no produjo inhibición para su control positivo (ampicilina). Esta última tenía una concentración de 50 µL/ml según recomendaba la literatura (59). Tanto *E. coli* como *P. aeruginosa* han sido clasificadas por la OMS como patógenos con resistencia crónica (Gráfico 12).

El extracto de fruta inhibió a todos los patógenos ensayados, en especial para *V. vulnificus*, *V. harveyi* y *E coli* con radios de halo de 19.83, 16.33 y 15.17 mm en TSA y 16, 14 y 13 mm en LB respectivamente, Cabe señalar que hubo mayor inhibición de estos microorganismos en el medio de cultivo TSA. Caso contrario, ocurrió para *S. Typhimurium*, *V. parahaemolyticus* y *E. faecalis* cuyos halos tenían un radio de 8.25, 10.88 y 10.33 mm en LB agar y 7.33, 8.00 y 5.00 mm en TSA respectivamente (Gráfico 11-12). No hubo diferencias halos en *P.*

propionicum, *S. aureus*, *B. cepacia* y *P. aeruginosa* que dependa del tipo de medio de cultivo (Gráfico 10).

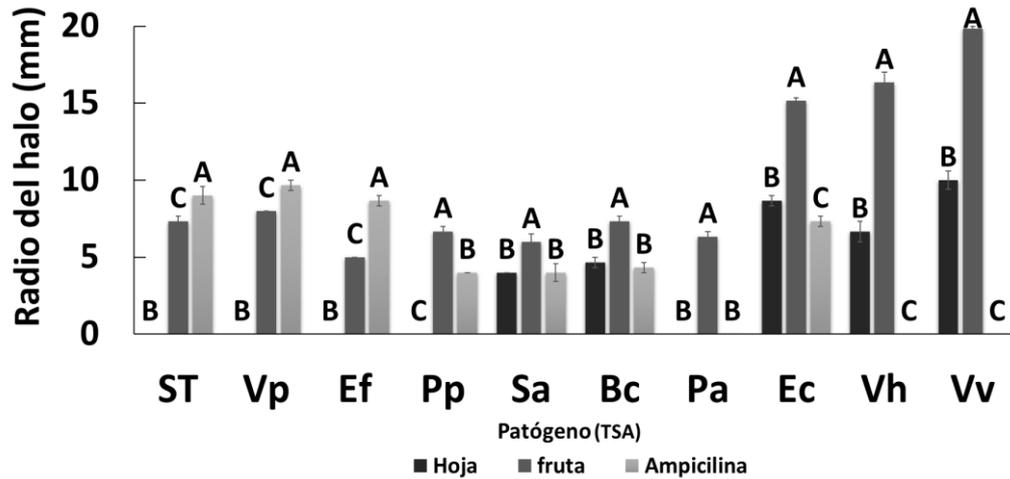


Gráfico 8. Medición de halos de inhibición en medio TSA del extracto de fruta, de hojas y control (+) (ampicilina) a las 24 h de incubación. Letras distintas indican diferencias significativas entre cada patógeno con los 3 tratamientos ($p < 0,05$)

Es muy importante indicar que sólo en LB se observó la acción inhibitoria del extracto de hoja contra los patógenos *S. Typhimurium*, *V. parahaemolyticus* y *E. faecalis* de 4.25, 5.75 y 4.83 mm respectivamente. No se observaron efectos significativos de los medios de cultivo en los halos de inhibición de *P. propionicum*, *S. aureus*, *B. cepacia* y *P. aeruginosa* (Gráfico 8,9). La mayor inhibición observada en el presente estudio fue de 19,83 mm y resultó de la prueba del extracto de fruta contra *Vibrio vulnificus*, seguido de *V harveyi* y *E. coli* con halos de 16,33 y 15,17 mm respectivamente en medio TSA (Gráfico 8).

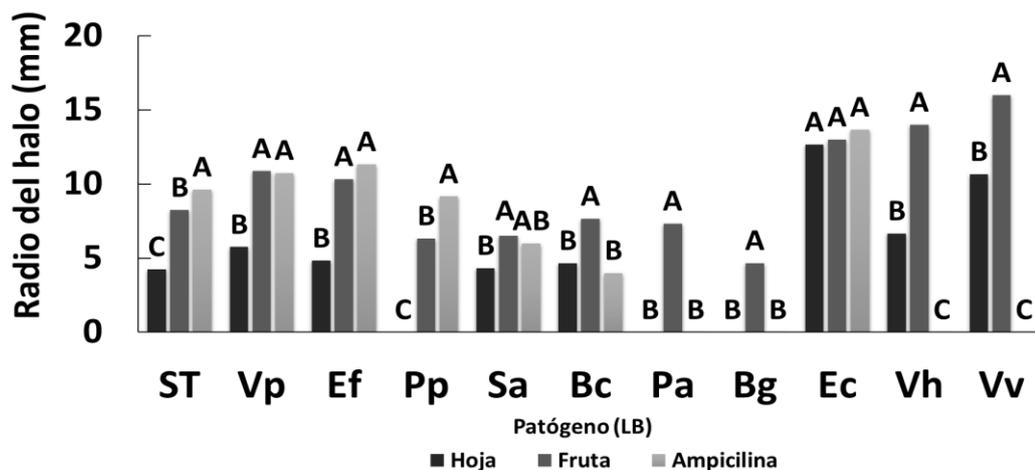


Gráfico 9. Medición de halos de inhibición en medio LB agar del extracto de fruta, de hojas y control (+) (ampicilina) a las 24 h de incubación. Letras distintas indican diferencias significativas entre cada patógeno con los 3 tratamientos ($p < 0,05$)

El extracto de hoja no inhibió el crecimiento de *P. propionicum* y *P. aeruginosa* para ningún medio de cultivo. Tampoco hubo inhibición para *S. Typhimurium*, *V. parahaemolyticus* y *E. faecalis* en medio TSA, pero si se observó en LB agar como se menciona en el párrafo anterior (Gráfico 8,9,10). Este resultado puede indicar que el extracto en hoja obtuvo un mejor factor de difusión o que reaccionó de mejor manera en LB agar. Esta situación es parecida a lo ocurrido en el trabajo elaborado por Shen *et. al.*, 2014 donde la inhibición en *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes* fue poco detectable solo en TSB (7).

El artículo escrito por Pervin *et. al.*, 2013 reporta el gran poder de inhibición del extracto de hoja del *V. corymbosum* frente a *Salmonella typhimurium* pero bajo en *Enterococcus faecalis* (23.18 y 14.08 mm respectivamente) (6), lo cual es corroborado en la presente investigación, donde además de la fruta, las hojas del mortiño ecuatoriano también genera un efecto inhibitorio frente a algunos patógenos humanos.

Los compuestos fenólicos en los arándanos pueden contribuir al efecto antimicrobiano según otras investigaciones enfocadas en el contenido de fenoles en las bayas y su potencial efecto terapéutico (60). También han indicado que los compuestos fenólicos que contenían grupos hidroxilo mostraron toxicidad fenólica, y se pensó que su principal factor inhibitorio es la actividad enzimática de los microorganismos (61). En un estudio por Pérez *et. al.*, 2011 demostró la relación que existe entre la resistencia de *E. coli* a distintos antibióticos y la presencia de beta-lactamasas de espectro extendido (enzima producida por algunas bacterias, responsable de la resistencia) (62).

Los halos de menor radio se observaron en las bacterias Gram (+) *E. faecalis*, *P. propionicum* y *S. aureus*, lo cual se deba posiblemente a la baja interacción con la pared celular. Además de la preocupante resistencia a los antibióticos que poseen las bacterias Gram (+), Rincón *et. al.*, 2014 postuló un engrosamiento de la pared celular que contribuye a “atrapar” la vancomicina en las capas más externas de pepti-doglucono, evitando su interacción con los precursores del peptidoglucono que emergen del citoplasma y permitiendo una síntesis activa de la pared celular en presencia del antibiótico (63). Los siguientes patógenos que tuvieron menor halo fueron *B. cepacia* y *S. aeruginosa*, clasificadas por la OMS como microorganismos con resistencia crítica (64).

En *V. corymbosum* L. Shen *et. al.*, 2014, demostró que los ácidos fenólicos, tales como el gálico y los ácidos caféicos, son potenciales inhibidores metabólicos de la prolina en *L. monocytogenes* (7). Apostolidis *et. al.*, 2008 evaluó la eficacia de extractos fenólicos solubles en agua de orégano y arándano en combinación con lactato de sodio para el control de *L. monocytogenes* en carne cocida, donde demostraron el gran potencial como inhibidores metabólicos de la prolina en *L. monocytogenes* (65).

Yow *et. al.*, 2012 afirma que los compuestos fenólicos pueden formar complejos con las proteínas de la membrana externa de microorganismos a través de fuerzas no específicas, tales como enlaces de hidrógeno y efectos hidrófobos, entre otros (66). Estas interacciones resultan en la muerte de estos microorganismos y es lo que posiblemente haya ocurrido en este ensayo.

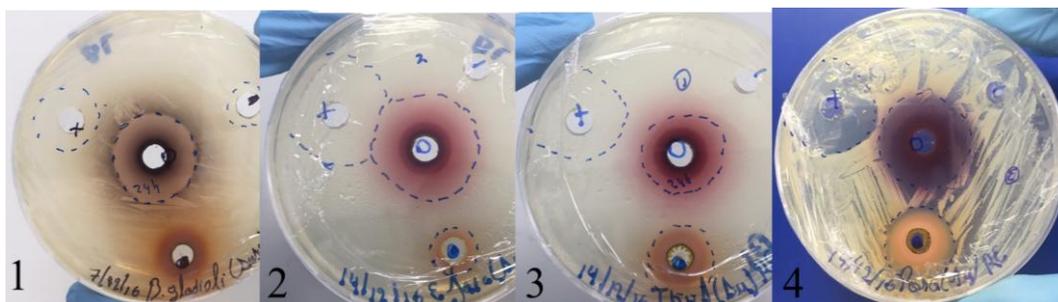


Gráfico 10. Halos de inhibición *B. gladioli* (1); *E. faecalis* (2); *S. Typhimurium* (3); *V. parahaemolyticus* (4). A las 24 h. Controles: + y –

Extracto de pulpa: 0,6988 g/mL ○
 Extracto de hoja: 0,2365 g/mL ●

En la Tabla IV del análisis de correspondencia, se muestran los rangos obtenidos para la inhibición de hojas, frutos y ampicilina. Donde se observa que los halos de inhibición baja y alta se agruparon con bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente (Gráfico 11). De forma similar, los halos de inhibición bajo y medio-bajo se agruparon con el potencial medio, alto y crítico de resistencia a los antibióticos, mientras que los halos de alta inhibición se agruparon con el bajo potencial de resistencia a los antibióticos (Gráfico 12).

Tabla III. Las categorías de rangos de halos de inhibición obtenidos mediante pruebas in vitro contra todos los patógenos descritos en el gráfico 11

Rango categoría	Extracto de hoja	Extracto de fruta	Ampicilina (50µg/ml)
Bajo	0.0 mm	Below 7.0 mm	0.0 mm
Medio-bajo	Desde 0.1 to 5.0 mm	Desde 7.1m to 8.5 mm	Desde 0.1 to 5.5 m
Medio-alto	Desde 5.1 to 6.9 mm	Desde 8.6 to 12.5 mm	Desde 5.6 to 10.5 mm
alto	Desde	Desde 12.6 to 17.0 mm	Desde 10.6 to 14.0 mm

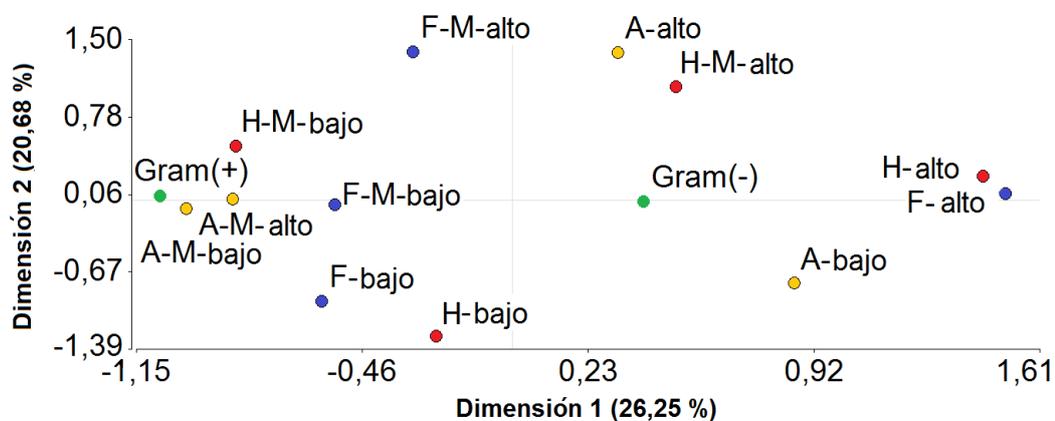


Gráfico 11. Análisis de correspondencia entre bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y tamaño de halo

El análisis por correspondencia agrupó el tamaño de los halos con la resistencia esperada a los antibióticos según lo informado por la OMS (45). Tamaños bajos de halo agrupados con cepas altamente resistentes y viceversa. Los resultados respaldan el informe de la OMS que sugiere que los patógenos probados poseen mecanismos innatos de resistencia a antibióticos de amplio espectro, incluyendo ampicilina y otros antimicrobianos naturales (45).

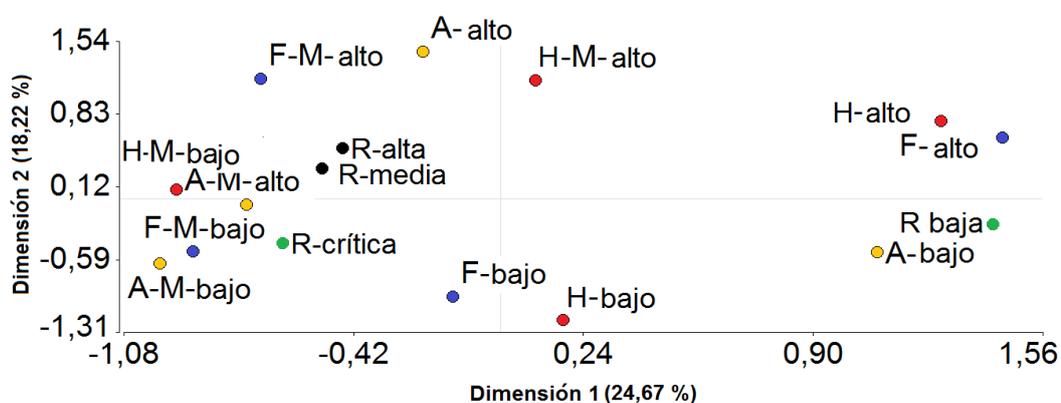


Gráfico 12. Análisis de correspondencia entre la clase de resistencia y el tamaño del halo

4.3 Caracterización genética

Este estudio nos proporcionó una evaluación inicial sobre la diversidad genética del mortuño y se logró subir a la base de datos del NCBI las cuatro secuencias de la región matK y una de la región de rbcL Tabla IV. Es importante señalar que la base de datos del NCBI no

contaba con ninguna secuencia subida que identificaba al *V. floribundum* en la región rbcL, como consecuencia, no había la posibilidad de comparar dicha región para su respectiva identificación. Dado esto, el árbol de rbcL, a diferencia del construido mediante la región matK, se tuvo que alinear con una secuencia matK, ya que es la primera vez que se registra la secuencia de la región rbcL del mortiño localizado en Ecuador (Gráfico 14).

En el árbol filogenético representado mediante un cladograma se observó que las 11 secuencias se agruparon con una accesión completa identificada con el código AF382804 descrita como *Vaccinium floribundum* Kunth, única secuencia registrada en el NCBI y con una similitud del 100 % (Gráfico 13). Además, se observó que el grupo se Cotopaxi (CoX) de aleja con una distancia de 0,002 con respecto a las demás Tabla V.

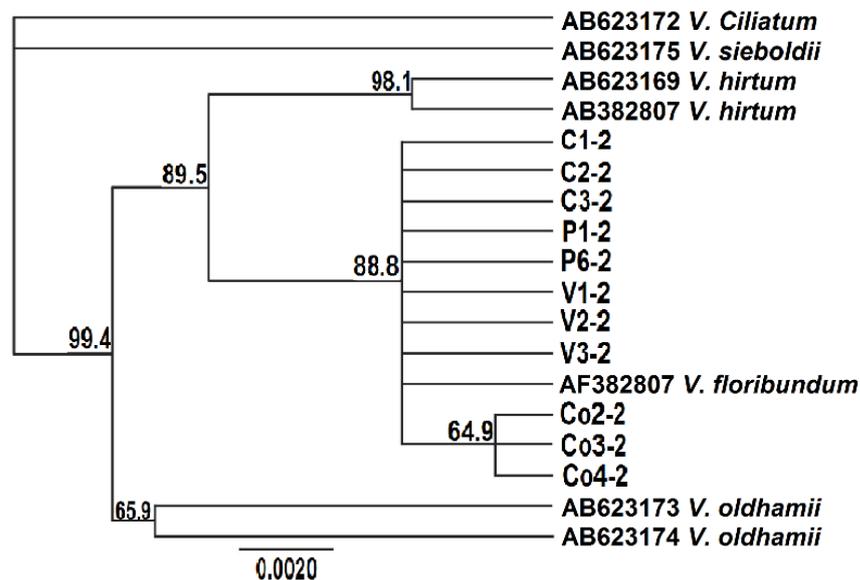


Gráfico 13. Árbol filogenético de la región matK obtenido por Neighbor Joining y 1000 bootstraps

La región matK del mortiño evidenció cierta variación genética y es posible que se encuentre relacionada con la geografía del país. Según Hilo *et. al.*, 1997, la región de codificación de matK exhibe una característica particular, ya que presenta una distribución casi igual de las sustituciones de nucleótidos de la primera, segunda y tercera posición del codón y que de esta forma, el gen matK puede evolucionar más rápido en contraste con otros genes (67). Por ende, es una región que brinda bastante confianza para realizar análisis genéticos. Borsch *et. al.*, 2009 argumenta que dicha región provee la más alta estructura filogenética, y además ofrece la información requerida incluso en nodos más profundos (68). Esto se logra evidenciar por la distribución de los clados del árbol filogenético utilizando las secuencias de la región matK, por la forma en que se agrupan las secuencias pertenecientes a Cotopaxi (Cox) (Gráfico 9).

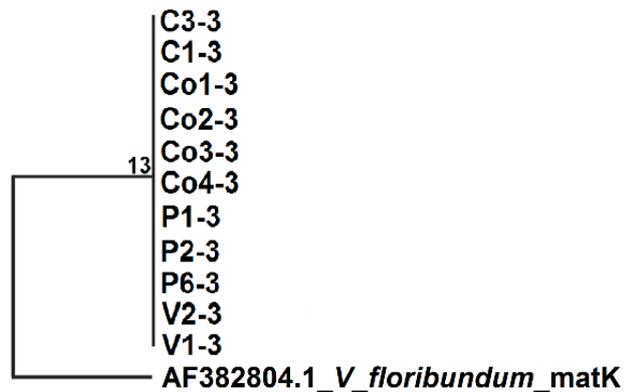


Gráfico 14. Árbol filogenético de la región rbcL obtenido por Neighbor Joining y 1000 bootstraps

Los resultados obtenidos por Ligarreto *et. al.*, 2010 indicaron que las poblaciones naturales de *Vaccinium meridionale* podrían estar afectadas por condiciones climáticas altamente heterogéneas, en diferentes áreas geográficas de la República de Colombia (69). El estudio señaló una reducción en el tamaño de las hojas inversamente proporcional al aumento de la altitud, siendo esto muy común en las especies de *Vaccinium*, y que podría deberse a las bajas temperaturas y a la resistencia al nitrógeno (70). Según Mingeau *et. al.*, 2001 Indicó que, el número de flores en *V. corymbosum*, se redujo bajo un determinado estrés hídrico (71,72).

Con respecto a las condiciones climáticas y geológicas que podrían haber contribuido al polimorfismo, se puede mencionar que la provincia de El Cotopaxi posee el segundo volcán más alto y peligrosa del mundo El Quilotoa, además de ser un volcán activo y que está ubicada en la zona llamada "Avenida de los Volcanes" llamada así por Humboldt en 1802.

El Cotopaxi es el ejemplo típico de un estratovolcán, que es el resultado de la acumulación de rocas, arena y ceniza de sucesivas erupciones, de modo que la vegetación ha sufrido adaptaciones especiales para soportar y desarrollarse en un clima y suelo tan rigurosos. De acuerdo con el Ministerio de Medio Ambiente del Ecuador (MAE), los gases emitidos durante las erupciones volcánicas, conducen a la formación de lluvia ácida que afecta nocivamente al crecimiento y desarrollo normal de la vegetación, provocando abrasión y heridas en la superficie de las hojas y flores. Además, su composición química puede tener un efecto contaminante (51).

UICN, 2014, refiere que El Cotopaxi ha tenido 35 erupciones de magnitud variable desde 1534. Este proceso continuo de erupciones ha sido determinante para delinear las características que observamos hoy en la tundra (73). Finalmente, la temperatura de 9 °C es también un factor que pudo haber contribuido a la adaptación que se expresa en el polimorfismo mortuño en esta provincia (51).

Con lo antes expuesto, se puede expresar que las plantas del género *Vaccinium sp.* son afectadas por factores genéticos y ambientales. Estas variaciones fenotípicas ligadas a factores ambientales podrían inferir la manera de interpretar la Tabla V, donde se observa una distancia genética de 0,002 entre las secuencias de las plantas de Cotopaxi (Cox) con respecto a las secuencias de *V. floribundum* de las demás provincias del Ecuador y la obtenida en la base de datos del NCBI (AF382804). Esta distancia (0,002) indica que existe una pequeña variación entre los grupos de plantas de las distintas provincias, pero que tampoco es lo suficientemente alta para clasificarla como de otra especie de *Vaccinium*.

Tabla IV. Secuencias de la región genética *matK* y *rbcl* subidas a la base de datos del NCBI.

Secuencias	Descripción
KP973414	<i>Vaccinium floribundum</i> isolate C1-2_A04 maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast
KP973415	<i>Vaccinium floribundum</i> isolate Co2-2_A08 maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast
KP973416	<i>Vaccinium floribundum</i> isolate P1-2_A01 maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast
KP973417	<i>Vaccinium floribundum</i> isolate V1-2_A11 maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast
KP973418	<i>Vaccinium floribundum</i> isolate C1-3_B04 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, partial cds; chloroplast

Adicionalmente, se detectó un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en la posición 739 del gen *maturase k (matK)*. Todos los aislados de la provincia de Cotopaxi presentaron la variación en el nucleótido G (guanina), mientras que en la misma posición los aislados de las provincias de Pichincha y Carchi más un aislado de la región de los Andes (AF382804) presentaron el nucleótido C (citosina).

Tabla V. Comparación de distancias genéticas con el método pairwise distances de MEGA

Secuencias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 V2-2_MatK_A12_A12.ab1_1														
2 V1-2_MatK_A11_A11.ab1	0,000													
3 P6-2_MatK_A03_A03.ab1	0,000	0,000												
4 P1-2_MatK_A01_A01.ab1	0,000	0,000	0,000											
5 Co4-2_MatK_A10_A10.ab1	0,002	0,002	0,002	0,002										
6 Co3-2_MatK_A09_A09.ab1	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000									
7 Co2-2_MatK_A08_A08.ab1	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000								
8 C3-2_MatK_A06_A06.ab1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002							
9 C2-2_MatK_A05_A05.ab1	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002						
10 C1-2_MatK_A04_A04.ab1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002					
11 AF382807.1_v_hirtum_matK	0,008	0,008	0,008	0,008	0,010	0,010	0,010	0,008	0,010	0,008				
12 AF382804.1_V.floribundum_matK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002	0,000	0,008			
13 AB623175.1_V.sieboldii_matK	0,008	0,008	0,008	0,008	0,010	0,010	0,010	0,008	0,010	0,008	0,008	0,008		
14 AB623172.1_V.ciliatum_matK	0,008	0,008	0,008	0,008	0,010	0,010	0,010	0,008	0,010	0,008	0,008	0,008	0,000	
15 AB623169.1_V.hirtum_matK	0,006	0,006	0,006	0,006	0,008	0,008	0,008	0,006	0,008	0,006	0,002	0,006	0,006	0,006

4.4 Micropropagación

4.4.1 Fase de Desinfección

4.4.1.1 Dióxido de cloro

Como mencionó Torres *et. al.*, 2010 en su artículo, es necesario establecer métodos apropiados para cada especie, más aún si la especie es considerada recalcitrante y a la vez silvestre. Estudios han demostrado que, los esquejes provienen de plantas silvestres, traen consigo un sinnúmero de patógenos a los cuales se los deben eliminar con una serie de métodos estratégicos (25,74). El gráfico 11 y 12 muestran los resultados de mortalidad y desinfección, cuyos resultados sugieren que el tiempo de sumersión adecuado fue de 10 minutos para esquejes frágiles y de 20 minutos para los más rígidos (43).

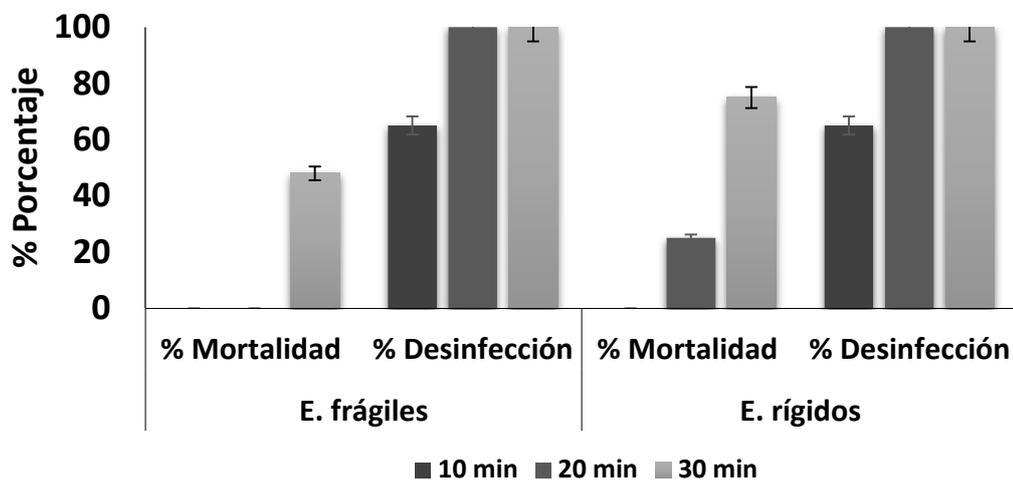


Gráfico 15. Efecto del dióxido de cloro en la desinfección de explantes frágiles y rígidos de *V. floribundum*

Según Teixeira *et. al.*, 2015, el hipoclorito es uno de los desinfectantes superficiales más frecuentes para los ensayos de cultivo *in vitro*, aplicado solo o en combinación con etanol (70 %) (75) y que, esquejes provenientes de plantas silvestres necesitan una estrategia de desinfección aparte, pero que a la vez no resulte en la afectación en el restablecimiento de explante. Ya se han realizado estudios con respecto al uso del ClO_2 como desinfectante y no han apreciado ningún daño o perturbación a los propágulos. Estudios en Japón sobre las especies de *Anthurium* (75), sugieren que la no ocurrencia de perturbación sobre los propágulos, se debe a que la esterilización química, puede causar menos cambios en la composición química de los medios de cultivo una vez que se encuentran en contacto con el esqueje que ha absorbido el ClO_2 (43).

4.4.1.2 Fungicida Carbendazím

La desinfección que resultó con mayor éxito, fue la que incluía el medio MS semisólido (fitagel al 1 %) con carbendazím al 0.05 % (Gráfico 14b y 14c), durante dos semanas (76). Esta prueba produjo una desinfección del 100 % sin mortalidad sobre los esquejes (Gráfico 13). A diferencia de estudios realizados por Castro-Restrepo, 2013 de desinfección con carbendazím en esquejes de *Vaccinium meridionale* en Colombia, en donde alcanzó solamente un 45 %, en medio sólido (76), a diferencia de los resultados de este estudio en el cual se alcanzó una desinfección del 100 %.

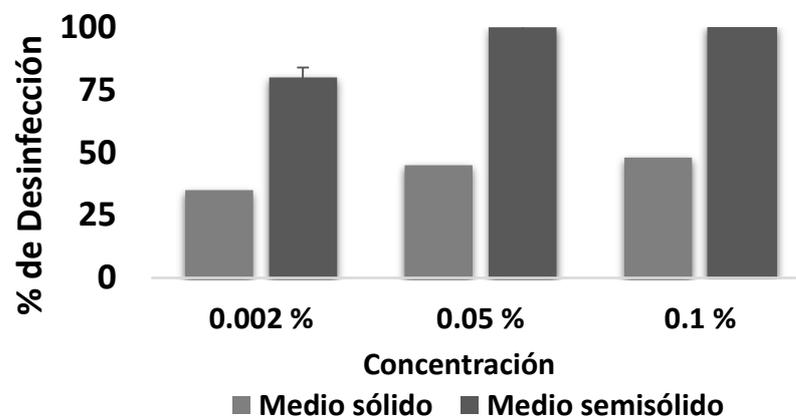


Gráfico 16. Efecto de la concentración del carbendazím sobre la desinfección de explantes de mortiño

Estos importantes resultados se deben a que, el medio semisólido facilitó la absorción del fungicida a los tejidos de los esquejes, cuyo mecanismo fue mucho más rápido que la velocidad del crecimiento del hongo por sí mismo (43). Pasado este obstáculo, se prosiguió a colocar los esquejes estériles en una matriz de medios.

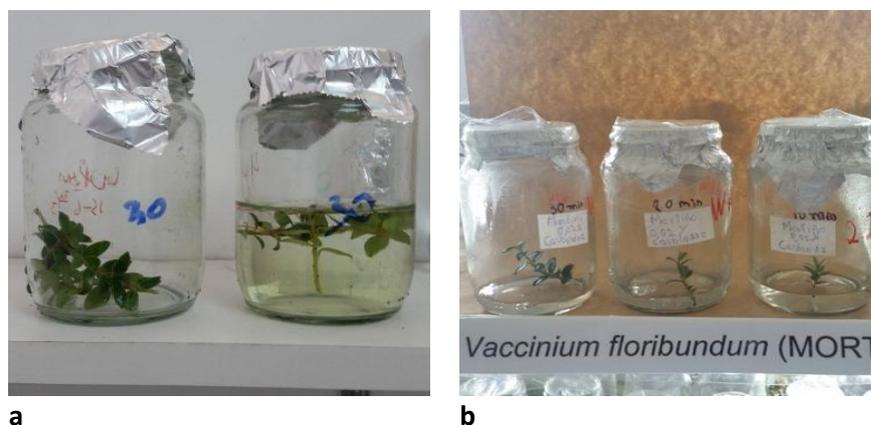


Gráfico 17. Desinfección con ClO₂ al 2 %; b. Carbendazim (0.1; 0.5; 1%) en medio MS

4.4.2 Fase de restablecimiento

El medio WPMm con IAA y BAP a 10 μ M de concentración de cada hormona, produjo un mejor establecimiento y brotación de los esquejes provenientes de yemas axilares de las plantas aclimatadas en el invernadero. El ácido indolacético (AIA), fue la auxina apropiada para este ensayo, ya que inhibe el desarrollo de brotes axilares laterales, manteniendo dominancia apical, creando de esta manera los brotes apicales. La benzilaminopurina (BAP), fue la citoquinina que estimuló la división celular en tejidos no meristemáticos, que al interactuar con la auxina produjo la dediferenciación celular (Gráfico 15a). Por lo tanto, esto corrobora el trabajo realizado por Ostrolucká *et. al*, 2008, donde resalta la importancia en de lograr un equilibrio auxinas/citoquininas para no producir callos (23). Se logró obtener una tasa de multiplicación de 10,33 con la combinación IAA y BAP a 10 μ M de concentración. Tabla IV (Gráfico 15b y 16), a diferencia del estudio por Beraud *et. al.*, 2015, cuya tasa de multiplicación para *V corimbosum* L. de las variedades Brigitta y Legacy fueron de 3.3 y 2.66 respectivamente (77).

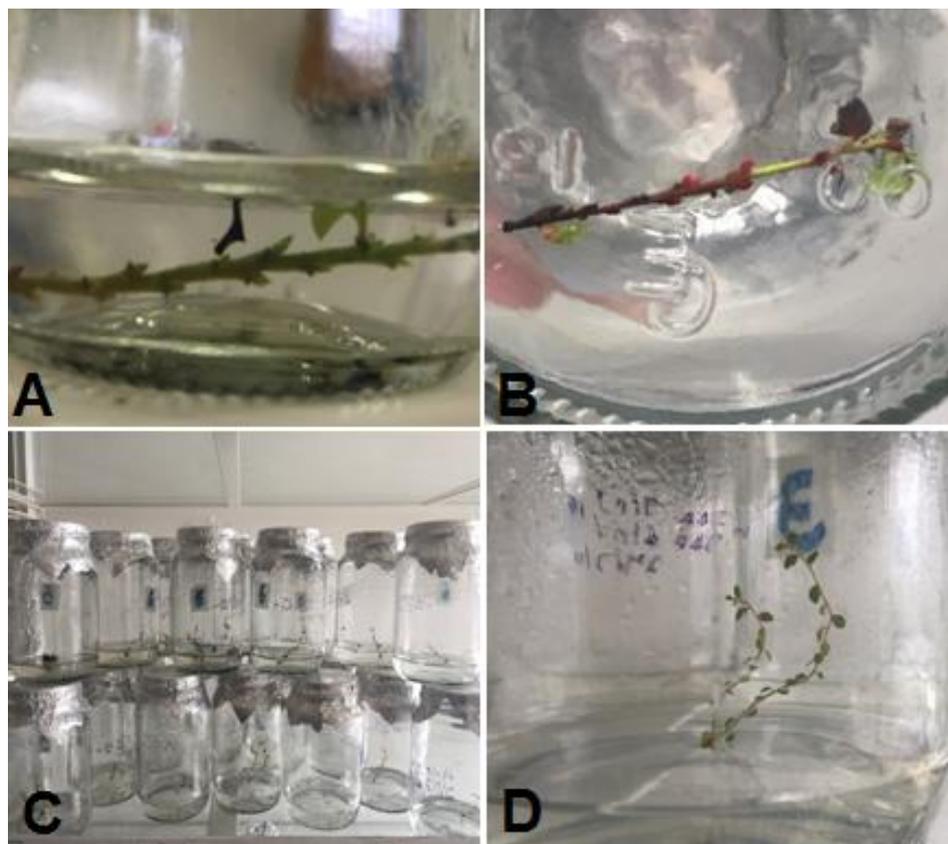


Tabla VI. Tasa de multiplicación

Brotes	IAA μ M		
BAP μ M	0,1	1	10
0,1	0	0	0
1	0	0	0
10	0	0	10,33



Gráfico 19. Brotes de 5 semanas de mortiño en medio WPM modificado

5. Conclusiones

- Las frutas obtenidas de las plantas de la provincia del Pichincha poseen mayor cantidad de polifenoles y antocianinas que la fruta de plantas de la provincia de Chimborazo y a pesar de estos resultados, las bayas de Chimborazo, obtuvo mayor capacidad antioxidante que las de Pichincha.
- Se observaron halos de inhibición tanto en el extracto de fruta como de hoja, algunos incluso mayores que el control positivo (Ampicilina).
- Se identificó a la especie endémica mortiño, como *V. floribundum*. También se observó un polimorfismo en la posición 739 del gen matK de la secuencia de la provincia de Cotopaxi.
- Se logró obtener un método eficiente de desinfección del 100 %, con el uso de ClO₂ y carbendazím en MS semisólido y una técnica adecuada para las etapas de micropropagación del cultivar con una tasa de multiplicación de 10,33.

6. Recomendaciones

Se debe aplicar otros protocolos y/o probar en otros equipos para la detección ácido ascórbico en los extractos de fruta del mortiño.

Se debe seguir investigando la etapa de enraizamiento y el endurecimiento en vivero para los brotes producidos en las fases de micropropagación mediante una matriz de reguladores de crecimiento que induzcan esta condición.

Se requiere medir capacidad antioxidante con los métodos FRAP y ORAC, para determinar el mecanismo de acción de los compuestos polifenólicos del mortiño.

Se necesitan estudios adicionales para examinar las aplicaciones de los arándanos o sus extractos en los productos alimenticios y medicamentos con fines de seguridad alimentaria y salud.

7. Bibliografía

1. Medina Cano CI, Lobo Arias M, Castaño Colorado AA, Cardona LE. Development analysis of Mortiño (*Vaccinium meridionale* Swart.) plants derived from clonal and sexual propagation. Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 2015 [citado 4 de febrero de 2017];16(1):65–77. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-87062015000100006
2. Howell AB. Update on Health Benefits of Cranberry and Blueberry. Acta Horticulturae [Internet]. marzo de 2009 [citado 10 de junio de 2016];(810):779-85. Disponible en: http://www.actahort.org/books/810/810_104.htm
3. Castro-Restrepo D, Álvarez-Guzmán JA. Clonal Micropropagation of Three Genotypes of Mortiño, *Vaccinium Meridionale* Sw., By Axillary Shoots Proliferation. Actualidades Biológicas [Internet]. diciembre de 2013 [citado 10 de junio de 2016];35(99):145-60. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0304-35842013000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=es
4. Moreno GAL, Aponte WST, Castillo CAA. Propagation of the neotropical fruit *Vaccinium meridionale* Swartz by air layering. Agronomía Colombiana [Internet]. 28 de junio de 2013 [citado 10 de junio de 2016];31(2):169-75. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/38006>
5. Ortiz J, Marín-Arroyo M-R, Noriega-Domínguez M-J, Navarro M, Arozarena I. Color, phenolics, and antioxidant activity of blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.), and apple wines from Ecuador. Journal of Food Science. 2013;78(7):C985-93.

6. Pervin M, Hasnat MA, Lim BO. Antibacterial and antioxidant activities of *Vaccinium corymbosum* L. leaf extract. Asian Pac J Trop Dis [Internet]. diciembre de 2013 [citado 13 de febrero de 2017];3(6):444-53. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4027337/>
7. Shen X, Sun X, Xie Q, Liu H, Zhao Y, Pan Y, et al. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. Food Control [Internet]. Enero de 2014 [citado 13 de febrero de 2017];35(1):159-65. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351300323X>
8. Vasco C, Riihinen K, Ruales J, Kamal-Eldin A. Phenolic compounds in *Rosaceae* fruits from Ecuador. J Agric Food Chem. 25 de febrero de 2009;57(4):1204-12.
9. Silva S, Costa EM, Costa MR, Pereira MF, Pereira JO, Soares JC, et al. Aqueous extracts of *Vaccinium corymbosum* as inhibitors of *Staphylococcus aureus*. 2015 [citado 10 de junio de 2016]; Disponible en: <http://repositorio.ucp.pt/handle/10400.14/17621>
10. Cobo MM, Gutiérrez B, Torres AF, Torres M de L. Preliminary analysis of the genetic diversity and population structure of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). Biochemical Systematics and Ecology [Internet]. febrero de 2016 [citado 10 de junio de 2016];64:14-21. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305197815002902>
11. Schreckinger M, Lila MA, Yousef G, de Mejia E. Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis* Proanthocyanidins. En: Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds [Internet]. American Chemical Society; 2012 [citado 10 de junio de 2016]. p. 71-82. (ACS Symposium Series; vol. 1109). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/bk-2012-1109.ch006>
12. Podwojewski P. Los suelos de las altas tierras andinas: los paramos del Ecuador. Boletín informativo - Sociedad Ecuatoriana de la Ciencia del Suelo [Internet]. 1999 [citado 10 de junio de 2016];(18):9-14. Disponible en: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010019247>
13. Cobo MM, Gutiérrez B, Torres AF, Torres M de L. Preliminary analysis of the genetic diversity and population structure of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). Biochemical Systematics and Ecology [Internet]. febrero de 2016 [citado 3 de febrero de 2017];64:14-21. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305197815002902>
14. Ruiz, H. Desarrollo de un vino de mortiño (arándanos) en la Corporación Gruppo Salinas de Ecuador. 2011;
15. Prencipe FP, Bruni R, Guerrini A, Rossi D, Benvenuti S, Pellati F. Metabolite profiling of polyphenols in *Vaccinium* berries and determination of their chemopreventive

- properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [Internet]. febrero de 2014 [citado 6 de febrero de 2017];89:257-67. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708513005323>
16. Lee J. Anthocyanin analyses of *Vaccinium* fruit dietary supplements. *Food Sci Nutr* [Internet]. 20 de enero de 2016 [citado 19 de marzo de 2017];4(5):742-52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5011382/>
 17. Aguilera-Otíz M, del Carmen Reza-Vargas M, Chew-Madinaveita RG, Meza-Velázquez JA. Propiedades funcionales de las antocianinas. *BIOTecnia* [Internet]. 2011 [citado 6 de febrero de 2017];13(2):16–22. Disponible en: <http://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/81>
 18. Cocetta G, Karppinen K, Suokas M, Hohtola A, Häggman H, Spinardi A, et al. Ascorbic acid metabolism during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit development. *Journal of Plant Physiology* [Internet]. julio de 2012 [citado 6 de febrero de 2017];169(11):1059-65. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161712001782>
 19. Conklin PL, Barth C. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell and Environment* [Internet]. agosto de 2004 [citado 6 de febrero de 2017];27(8):959-70. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.2004.01203.x>
 20. Nikolajevs Ln, Janulis Vj. Comparative Study of Anthocyanin Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activity in Bilberry (*Vaccinium Myrtillus* L.) and Blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.) Fruits. 2009 [citado 6 de febrero de 2017];66. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Ina_Jasutiene/publication/26762453_Comparative_study_of_anthocyanin_composition_antimicrobial_and_antioxidant_activity_in_bilberry_\(Vaccinium_myrtillus_L.\)_and_blueberry_\(Vaccinium_corymbosum_L.\)_fruits/links/550482b10cf24cee3a01575a.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Ina_Jasutiene/publication/26762453_Comparative_study_of_anthocyanin_composition_antimicrobial_and_antioxidant_activity_in_bilberry_(Vaccinium_myrtillus_L.)_and_blueberry_(Vaccinium_corymbosum_L.)_fruits/links/550482b10cf24cee3a01575a.pdf)
 21. Wicke S, Quandt D. Universal primers for the amplification of the plastid *trnK/matK* region in land plants. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* [Internet]. 30 de diciembre de 2009 [citado 5 de febrero de 2017];66(2):285-8. Disponible en: <http://rjb.revistas.csic.es/index.php/rjb/article/view/321/316>
 22. Aguilar G, A M de los, Terrazas T, Segura León O, Arias S, Vibrans H, et al. Caracterización molecular de tres especies de *Hylocereus* (*Cactaceae*) presentes en México. *Revista fitotecnia mexicana* [Internet]. marzo de 2013 [citado 5 de febrero de 2017];36(1):13-22. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0187-73802013000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
 23. Rojas González S, García Lozano J, Alarcón Rojas M. Propagación asexual de las plantas : conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas [Internet]. 2004

[citado 28 de enero de 2017]. Disponible en: <http://localhost:8080/handle/11348/4167>

24. Castro-Restrepo D, Álvarez-Guzmán JA. Clonal Micropropagation of Three Genotypes of Mortiño, *Vaccinium Meridionale* Sw., By Axillary Shoots Proliferation. Actualidades Biológicas [Internet]. diciembre de 2013 [citado 13 de febrero de 2017];35(99):145-60. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0304-35842013000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=es
25. Angulo AB, Matamoros RC, Gómez-Alpizar L. Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (*Vaccinium spp.*) a partir de segmentos foliares de dos procedencias. Agronomía Costarricense [Internet]. 2015 [citado 13 de febrero de 2017]; Disponible en: <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/19541>
26. Šimala D. Microclonal propagation of *Vaccinium sp.* and *Rubus sp.* and detection of genetic variability in culture *in vitro*. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research [Internet]. 2006 [citado 28 de enero de 2017];14:1. Disponible en: http://www.inhort.pl/files/journal_pdf/Suppl_1_2006/full2006_10.pdf
27. Torres M de LT, P DT, B VSA. Cultivo in vitro del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). ACI Avances en Ciencias e Ingenierías [Internet]. 1 de junio de 2010 [citado 17 de febrero de 2017];2(2). Disponible en: <http://revistas.usfq.edu.ec/index.php/avances/article/view/27>
28. García M. CL, Ligarreto M. GA. Effect of fruit size on the growth and development of Andean blueberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) seedlings from four locations in the Colombian Andes. Agronomía Colombiana [Internet]. 26 de marzo de 2014 [citado 13 de febrero de 2017];32(1):14-21. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/38714>
29. Goyal JC, Igamberdiev AU, Debnath SC. Morphology, phenolic content and antioxidant capacity of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) plants as affected by *in vitro* and *ex vitro* propagation methods. Canadian Journal of Plant Science [Internet]. noviembre de 2013 [citado 28 de enero de 2017];93(6):1001-8. Disponible en: <http://pubs.aic.ca/doi/abs/10.4141/cjps2012-307>
30. Ichihashi Y, Tsukaya H. Behavior of Leaf Meristems and their Modification. Front Plant Sci [Internet]. 1 de diciembre de 2015 [citado 13 de febrero de 2017];6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4664833/>
31. Venkateswarlu B, Korwar GR. Micropropagation Technology for Multipurpose Trees: From Laboratory to Farmers Fields. Research Bulletin, Central Research Institute for Dryland Agriculture, Hyderabad, India [Internet]. 2005 [citado 7 de febrero de 2017];1–30. Disponible en: <http://www.crida.in/Bulletins/Micropropagation.pdf>

32. Zhang L, Yue P, Jiang J, Fan J, Gao X. Effect of Phenolic Compounds on Antioxidant Activity in 8 Blueberry (*Vaccinum spp.*) Juices. Carpathian Journal of Food Science & Technology [Internet]. 2016 [citado 13 de febrero de 2017];8(2). Disponible en: http://chimie-biologie.ubm.ro/carpathian_journal/Papers%20vol_hm_files/19.Zhang%20Lingli%20revised.pdf
33. Vasco C, Ruales J, Kamal-Eldin A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. Food Chemistry [Internet]. 15 de diciembre de 2008 [citado 27 de mayo de 2017];111(4):816-23. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608005062>
34. Valls J, Millán S, Martí MP, Borràs E, Arola L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. Journal of Chromatography A. 2009;1216(43):7143-72.
35. Ehala S, Vaher M, Kaljurand M. Characterization of Phenolic Profiles of Northern European Berries by Capillary Electrophoresis and Determination of their Antioxidant Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry [Internet]. agosto de 2005 [citado 8 de marzo de 2017];53(16):6484-90. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf050397w>
36. Fredes C, Montenegro G, Zoffoli JP, Santander F, Robert P. Comparison of the Total Phenolic Content, Total Anthocyanin Content and Antioxidant Activity of Polyphenol-Rich Fruits Grown in Chile. Ciencia e investigación agraria [Internet]. abril de 2014 [citado 13 de febrero de 2017];41(1):9-10. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-16202014000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=en
37. Sarkis JR, Tessaro IC, Marczak LDF. Anthocyanin and anthocyanidin content of Highbush blueberries cultivated in Brazil. Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos. 2013;31(2):187-94.
38. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis [Internet]. septiembre de 2006 [citado 14 de febrero de 2017];19(6-7):669-75. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157506000081>
39. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis [Internet]. abril de 2016 [citado 9 de febrero de 2017];6(2):71-9. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177915300150>

40. Saarela JM, Sokoloff PC, Gillespie LJ, Consaul LL, Bull RD. DNA Barcoding the Canadian Arctic Flora: Core Plastid Barcodes (rbcL + matK) for 490 Vascular Plant Species. *PLoS ONE*. 2013;8(10).
41. Azmat MA, Khan IA, Cheema HMN, Rajwana IA, Khan AS, Khan AA. Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L. *J Zhejiang Univ Sci B* [Internet]. abril de 2012 [citado 22 de febrero de 2017];13(4):239-43. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3323937/>
42. Kron KA, Powell EA, Luteyn JL. Phylogenetic relationships within the blueberry tribe (*Vaccinieae*, *Ericaceae*) based on sequence data from matK and nuclear ribosomal ITS regions, with comments on the placement of *Satyria*. *Am J Bot*. febrero de 2002;89(2):327-36.
43. Cardoso JC, Teixeira da Silva JA. Micropropagation of gerbera using chlorine dioxide (ClO₂) to sterilize the culture medium. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* [Internet]. junio de 2012 [citado 14 de febrero de 2017];48(3):362-8. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s11627-011-9418-8>
44. Debergh PC, de Coster G, Steurbaut W. Carbendazim as an alternative plant growth regulator in tissue culture systems. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* [Internet]. abril de 1993 [citado 14 de febrero de 2017];29(2):89-91. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/BF02632258>
45. World Health Organization, editor. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014. 232 p.
46. Fredes C, Montenegro G, Zoffoli JP, Santander F, Robert P. Comparison of the Total Phenolic Content, Total Anthocyanin Content and Antioxidant Activity of Polyphenol-Rich Fruits Grown in Chile. *Ciencia e investigación agraria* [Internet]. abril de 2014 [citado 19 de marzo de 2017];41(1):9-10. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-16202014000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=en
47. Del B, Roursgaard M, Porrini M, Loft S, Møller P, Riso P. Different effects of anthocyanins and phenolic acids from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) on monocytes adhesion to endothelial cells in a TNF- α stimulated proinflammatory environment. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2016;60(11):2355-66.
48. Shalaby EA, Shanab SM. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African journal of pharmacy and pharmacology* [Internet]. 2013 [citado 2 de agosto de 2017];7(10):528–539. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/journal/AJPP/article-abstract/2CB260D31629>
49. Meriño-Gergichevich C, Ondrasek G, Zovko M, Šamec D, Alberdi M, Reyes-Díaz M. Comparative study of methodologies to determine the antioxidant capacity of Al-

- toxified blueberry amended with calcium sulfate. *Journal of soil science and plant nutrition* [Internet]. 2015 [citado 14 de febrero de 2017];15(4):965–978. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-95162015000400012&script=sci_arttext&lng=pt
50. Goyal JC, Igamberdiev AU, Debnath SC. Morphology, phenolic content and antioxidant capacity of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) plants as affected by *in vitro* and *ex vitro* propagation methods. *Can J Plant Sci* [Internet]. 16 de septiembre de 2013 [citado 19 de marzo de 2017];93(6):1001-8. Disponible en: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.4141/cjps2012-307>
 51. Chacón G, Gagnon D, Paré D. Comparison of soil properties of native forests, *Pinus patula* plantations and adjacent pastures in the Andean highlands of southern Ecuador: land use history or recent vegetation effects? *Soil Use and Management* [Internet]. Diciembre de 2009 [citado 24 de mayo de 2017];25(4):427-33. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1475-2743.2009.00233.x/abstract>
 52. Dragović-Uzelac. Evaluation of Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Blueberry Cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) Grown in the Northwest Croatia [Internet]. *FTB journal*. [citado 14 de febrero de 2017]. Disponible en: <http://www.ftb.com.hr/index.php/archives/61-volume-48-issue-no-2/161-evaluation-of-phenolic-content-and-antioxidant-capacity-of-blueberry-cultivars-vaccinium-corymbosum-l-grown-in-the-northwest-croatia>
 53. Samad NB, Debnath T, Ye M, Hasnat MA, Lim BO. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of Korean blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [Internet]. octubre de 2014 [citado 19 de marzo de 2017];4(10):807-15. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169115300216>
 54. Lai DQ, Tagashira N, Hagiwara S, Nakajima M, Kimura T, Nabetani H. Application of nanofiltration to recover benzoic acid from cranberry juice. *Food Science and Technology Research* [Internet]. 2012 [citado 21 de marzo de 2017];18(1):7–15. Disponible en: https://www.jstage.jst.go.jp/article/fstr/18/1/18_7/_article/-char/ja/
 55. Madrigal-Santillán E, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, Sumaya-Martínez MT, Gutiérrez-Salinas J, Bautista M, *et al.* Review of natural products with hepatoprotective effects. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(40):14787-804.
 56. Contreras RA, Köhler H, Pizarro M, Zúñiga GE. *In Vitro* Cultivars of *Vaccinium corymbosum* L. (*Ericaceae*) are a Source of Antioxidant Phenolics. *Antioxidants (Basel)* [Internet]. 9 de abril de 2015 [citado 21 de marzo de 2017];4(2):281-92. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4665469/>
 57. Al-Rejaie SS, Abuohashish HM, Al-Enazi MM, Al-Assaf AH, Parmar MY, Ahmed MM. Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *World J*

- Gastroenterol [Internet]. 14 de septiembre de 2013 [citado 21 de marzo de 2017];19(34):5633-44. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3769899/>
58. Navarro M, Núñez O, Saurina J, Hernández-Cassou S, Puignou L. Characterization of Fruit Products by Capillary Zone Electrophoresis and Liquid Chromatography Using the Compositional Profiles of Polyphenols: Application to Authentication of Natural Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [Internet]. 5 de febrero de 2014 [citado 19 de marzo de 2017];62(5):1038-46. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf404776d>
 59. Konaté K, Mavoungou JF, Lepengué AN, Aworet-Samseny RR, Hilou A, Souza A, et al. Antibacterial activity against β -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* [Internet]. 2012 [citado 19 de marzo de 2017];11:18. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-11-18>
 60. Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutritional Neuroscience* [Internet]. abril de 2005 [citado 27 de febrero de 2017];8(2):111-20. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10284150500078117>
 61. Mason TL, Bruce P. W. Inactivation of red beet β -glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry* [Internet]. enero de 1987 [citado 27 de febrero de 2017];26(8):2197-202. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003194220084683X>
 62. Pérez N, Pavas N, Rodríguez I. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* with extended spectrum beta-lactamase in a hospital at the Colombian Orinoquia. *Infectio* [Internet]. 2011 [citado 15 de marzo de 2017];15(3):147–154. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-93922011000300002&script=sci_arttext&lng=pt
 63. Rincón S, Panesso D, Díaz L, Carvajal LP, Reyes J, Munita JM, et al. Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. *Biomedica* [Internet]. abril de 2014 [citado 7 de septiembre de 2017];34(0 1):191-208. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4435674/>
 64. Organization WH. Antimicrobial resistance: 2014 global report on surveillance. *Antimicrobial resistance: 2014 global report on surveillance* [Internet]. 2014 [citado 15 de marzo de 2017]; Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153180149>

65. Apostolidis E, Kwon Y-I, Shetty K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. International Journal of Food Microbiology [Internet]. Diciembre de 2008 [citado 27 de febrero de 2017];128(2):317-24. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160508004947>
66. Yow CMN, Tang HM, Chu ESM, Huang Z. Hypericin-mediated Photodynamic Antimicrobial Effect on Clinically Isolated Pathogens†. Photochemistry and Photobiology [Internet]. mayo de 2012 [citado 27 de febrero de 2017];88(3):626-32. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.2012.01085.x>
67. Hilu V, H. Liang. The matK gene: sequence variation and application in plant systematics. Am J Bot. junio de 1997;84(6):830.
68. Borsch T, Quandt D. Erratum to: Mutational dynamics and phylogenetic utility of noncoding chloroplast DNA. Plant Systematics and Evolution [Internet]. enero de 2010 [citado 27 de febrero de 2017];284(1-2):129-129. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00606-009-0233-1>
69. Ligarreto GA, Patiño M del P, Magnitskiy SV. Phenotypic plasticity of *Vaccinium meridionale* (Ericaceae) in wild populations of mountain forests in Colombia. Revista de Biología Tropical [Internet]. junio de 2011 [citado 20 de agosto de 2016];59(2):569-83. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-77442011000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=en
70. Woodward FI. Ecophysiological studies on the shrub *Vaccinium myrtillos* L. taken from a wide altitudinal range. Oecologia [Internet]. 1 de noviembre de 1986 [citado 28 de febrero de 2017];70(4):580-6. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00379908>
71. Mingeau M, Perrier C, Améglio T. Evidence of drought-sensitive periods from flowering to maturity on highbush blueberry. Scientia Horticulturae [Internet]. 8 de junio de 2001 [citado 28 de febrero de 2017];89(1):23-40. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030442380000217X>
72. Vargas, Blanco. Fruit characterization of *Cocos nucifera* L. (Arecaceae) cultivars from the Pacific coast of Costa Rica and the Philippines | SpringerLink [Internet]. [citado 28 de febrero de 2017]. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1008771122733>
73. UICN. Los páramos andinos [Internet]. 2014 [citado 24 de mayo de 2017]. Disponible en: <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2014-025.pdf>
74. Corpoica. Mortiño es oro que florece silvestre [Internet]. [citado 20 de agosto de 2016]. Disponible en:

http://www.elcolombiano.com/historico/mortino_es_oro_que_florece_silvestre-OYEC_159304

75. Silva JAT da, Winarto B, Dobránszki J, Zeng S. Disinfection procedures for *in vitro* propagation of Anthurium. Folia Horticulturae [Internet]. 1 de enero de 2015 [citado 14 de febrero de 2017];27(1). Disponible en: <http://www.degruyter.com/view/j/fhort.2015.27.issue-1/fhort-2015-0009/fhort-2015-0009.xml>
76. Castro-Restrepo D, Álvarez-Guzmán JA. Clonal Micropropagation of Three Genotypes of Mortiño, *Vaccinium meridionale* Sw., by Axillary Shoots Proliferation. Actualidades Biológicas [Internet]. diciembre de 2013 [citado 14 de febrero de 2017];35(99):145-60. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0304-35842013000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=es
77. Rodríguez Beraud M, Morales Ulloa D. 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 [Internet]. 2015 [citado 10 de marzo de 2017];6(1):31-40. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2077-99172015000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es

ANEXOS

Tabla VII. Tiempo de retención y área de los picos obtenidos del cromatograma del HPLC

TR	Área
3,91	1281321,29
4,43	6264837,09
5,49	7422489,87

Tabla VIII. Matriz de hormonas para esquejes

Brotos	IAA uM		
	0,1	1	10
BAP uM	0,1	1	10
0,1	1a	1b	1c
1	2a	2b	2c
10	3a	3b	3c

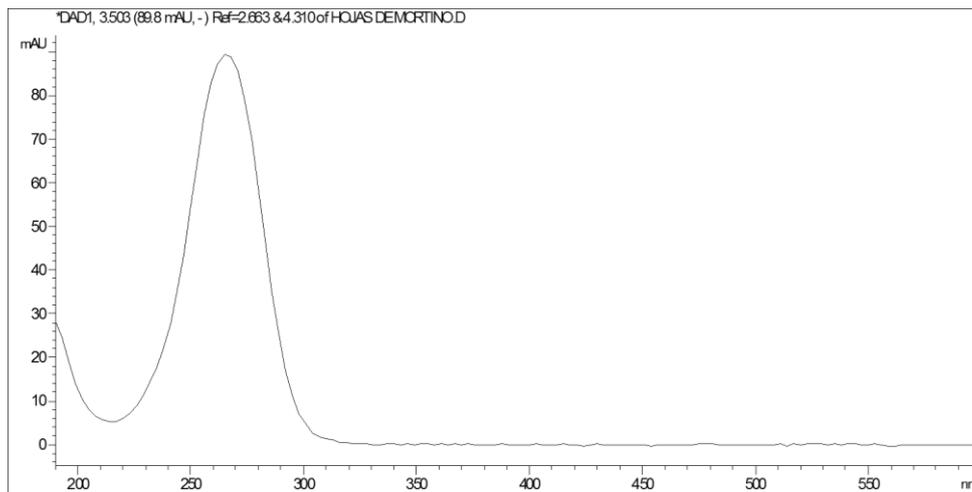


Gráfico 20. Espectro de ácido ascórbico estándar (1000 ppm)

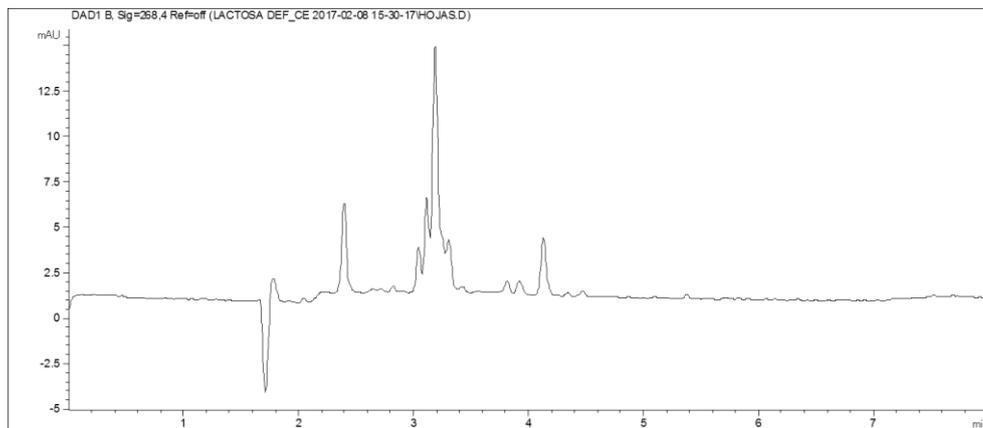


Gráfico 21 Electroferograma de hojas a 268 nm (Ácido Ascórbico)

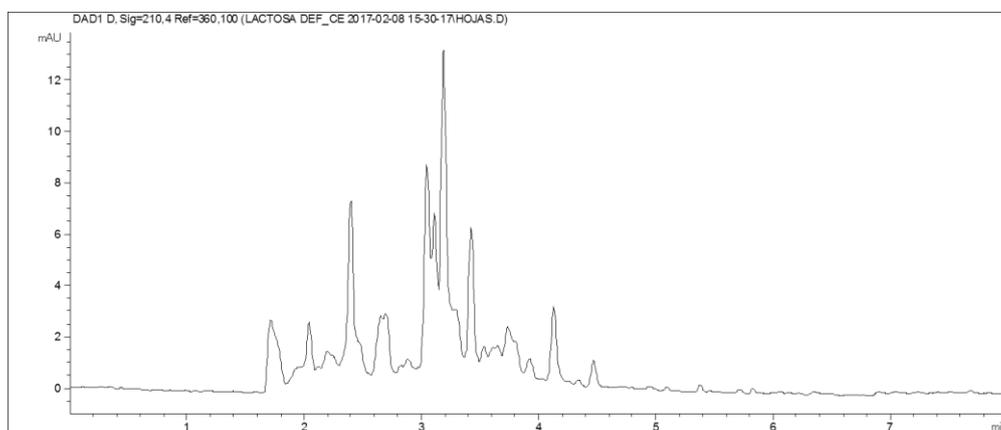


Gráfico 22. Electroferograma de hojas a 210 nm (polifenoles)

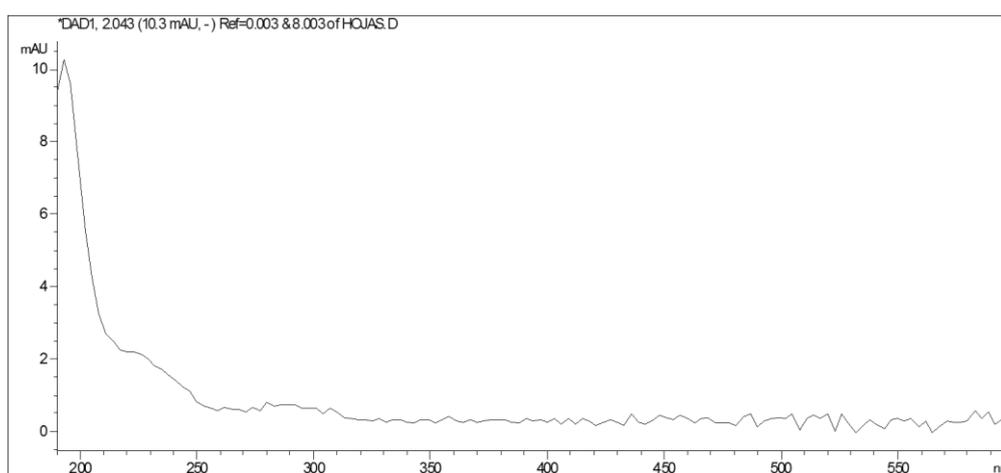


Gráfico 23. Tiempo 2.043 min (ácido ferúlico, derivado ácido benzoico) en hojas

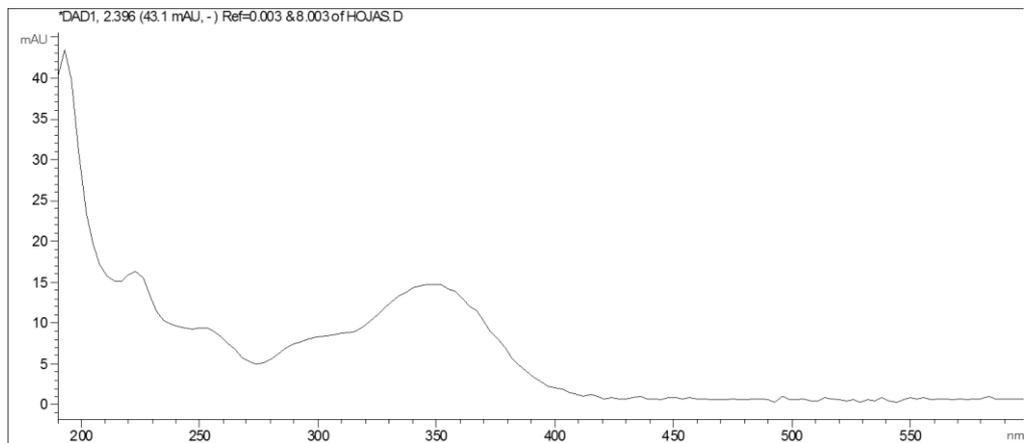


Gráfico 24. Tiempo 2.396 (derivado de naringenina)

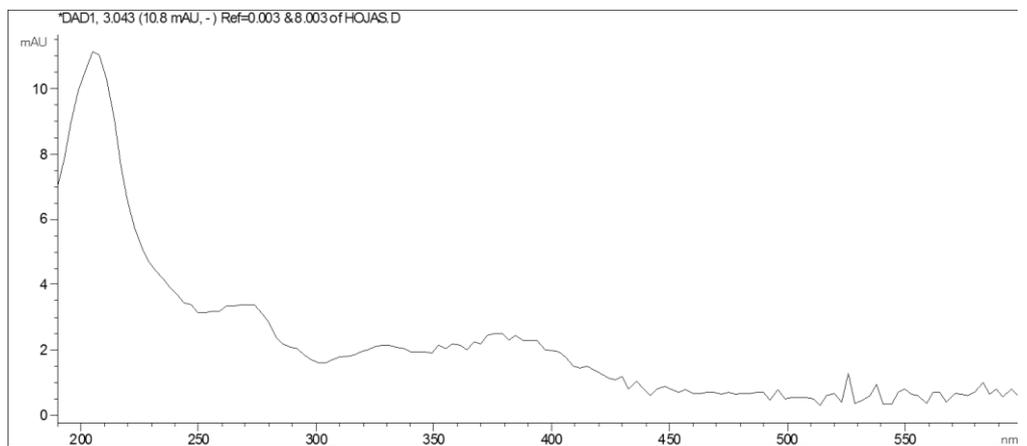


Gráfico 25. Tiempo 3.043 (Derivado de ácido gálico)

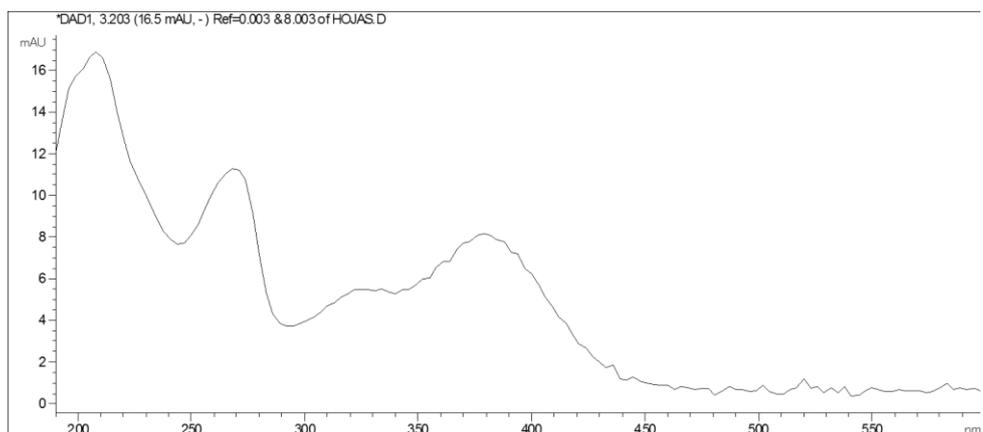


Gráfico 26. Tiempo 3.203 desconocido 1

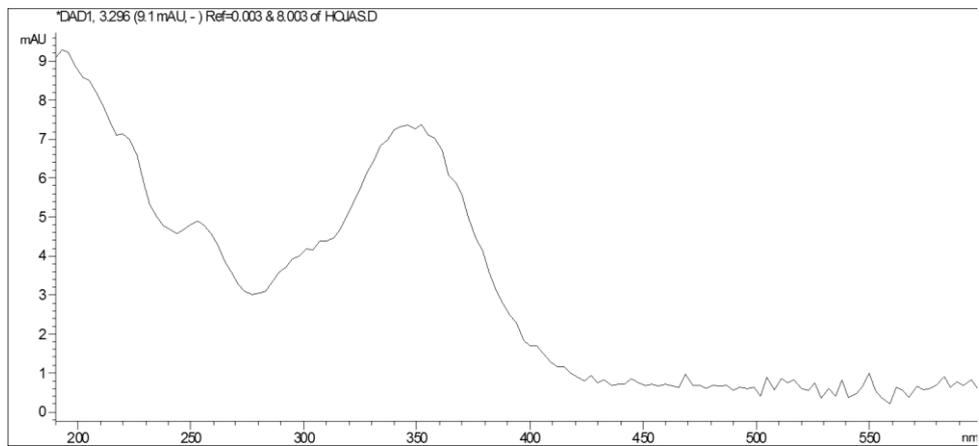


Gráfico 27. Tiempo 3.296 Desconocido 2

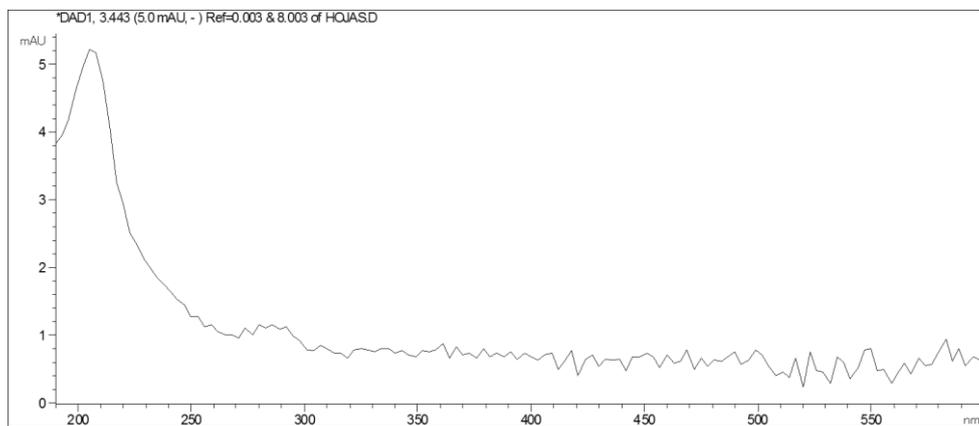


Gráfico 28. Tiempo 3.443 Desconocido 3

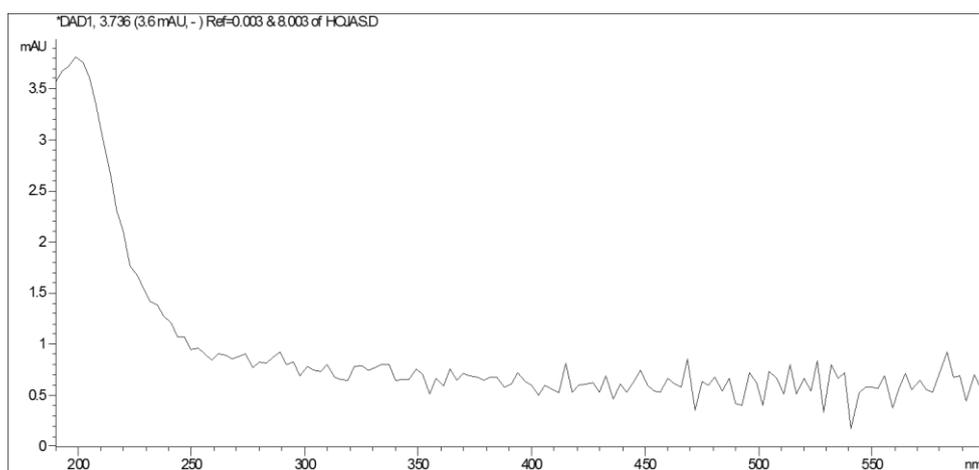


Gráfico 29. Tiempo 3.736 Desconocido 4

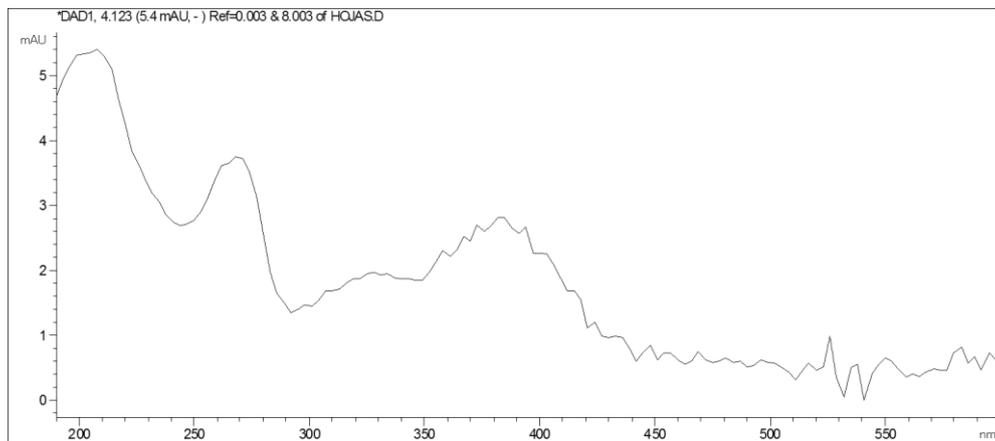


Gráfico 30. Tiempo 4.123 Desconocido 5

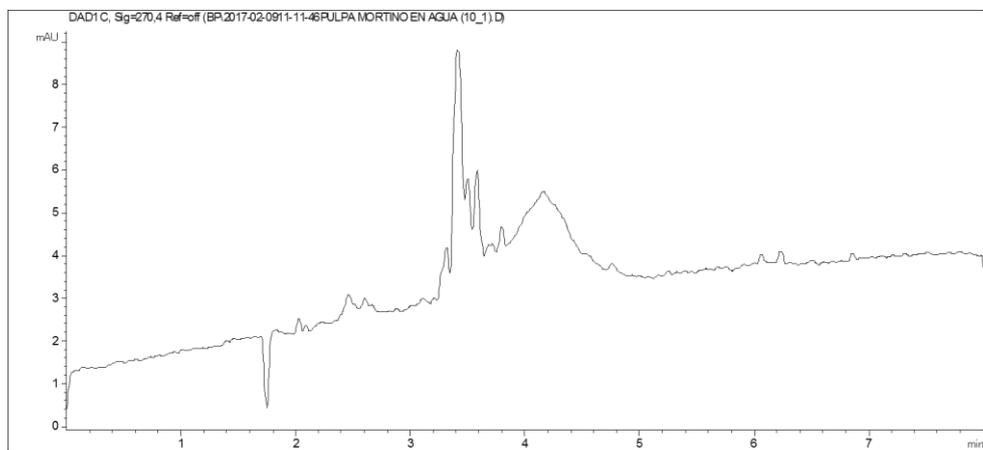


Gráfico 31. Electroferograma fruta de mortiño (270 nm), (sin ácido ascórbico)

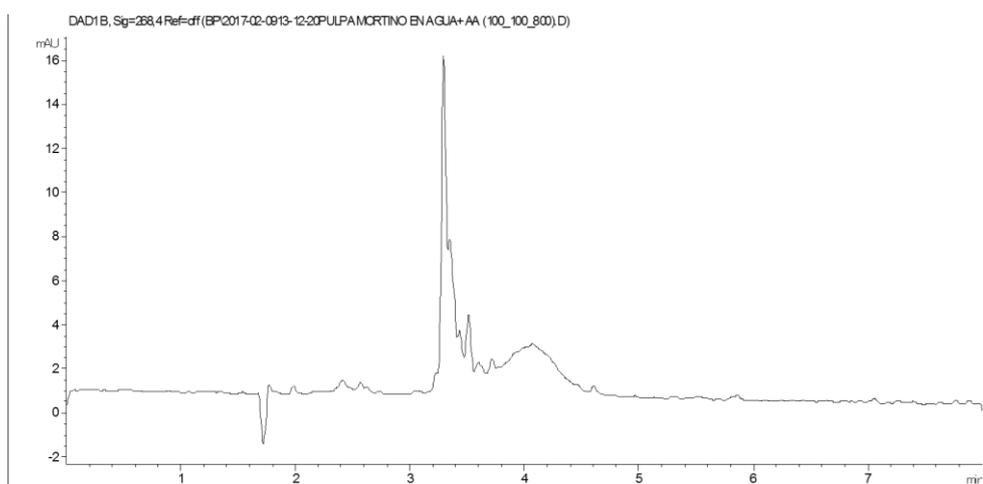


Gráfico 32. Electroferograma 268 nm (Fruta + Ácido Ascórbico 100:100:800)

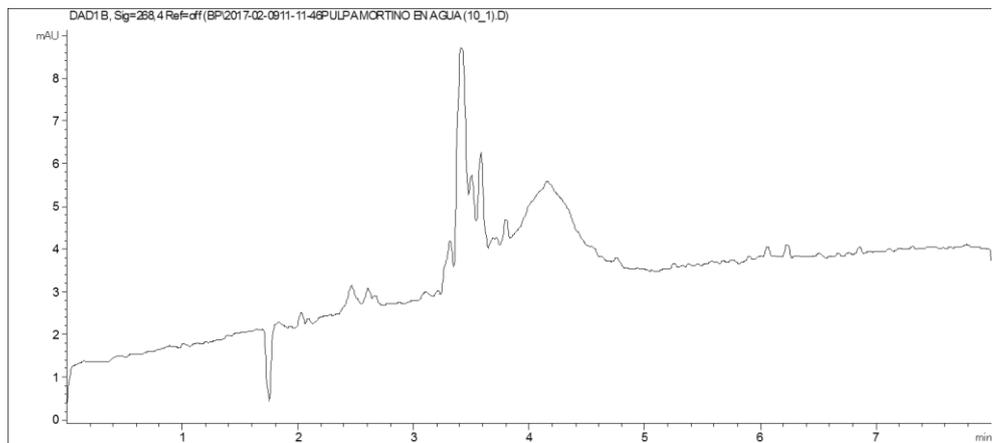


Gráfico 33. Electroferograma 268 fruta (Diluido 10 veces)

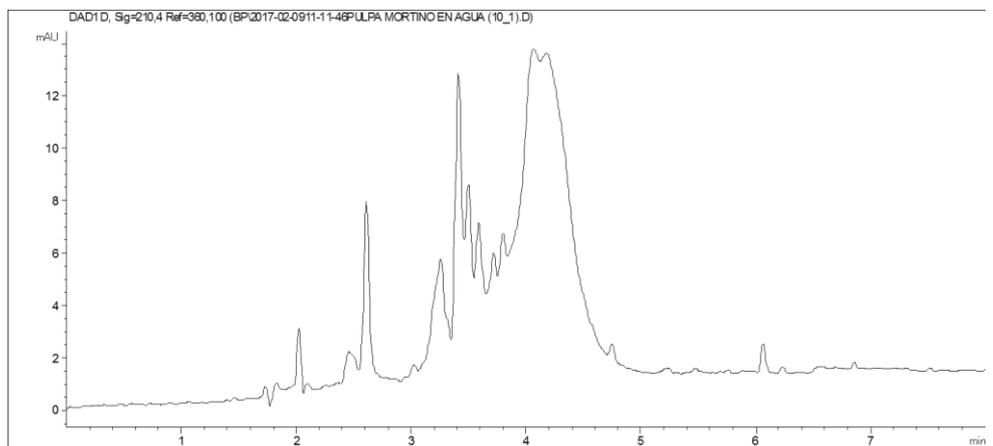


Gráfico 34. Electroferograma a 210 nm fruta de mortiño

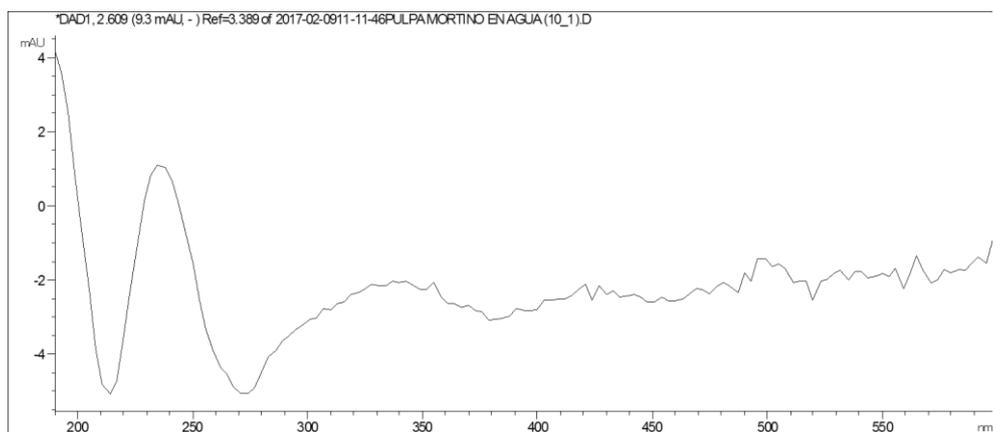


Gráfico 35. Tiempo 2.609 desconocido 6

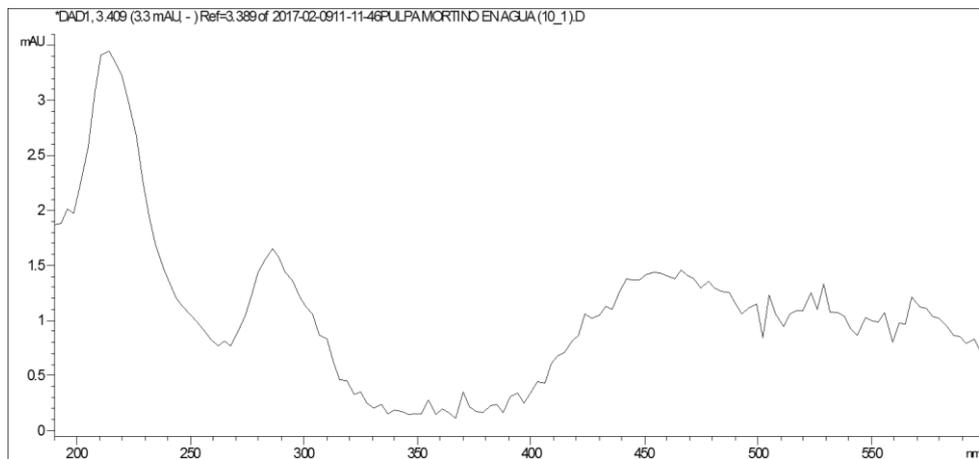


Gráfico 36. Tiempo 3.409 ácido fenólico derivado de ácido siríngico

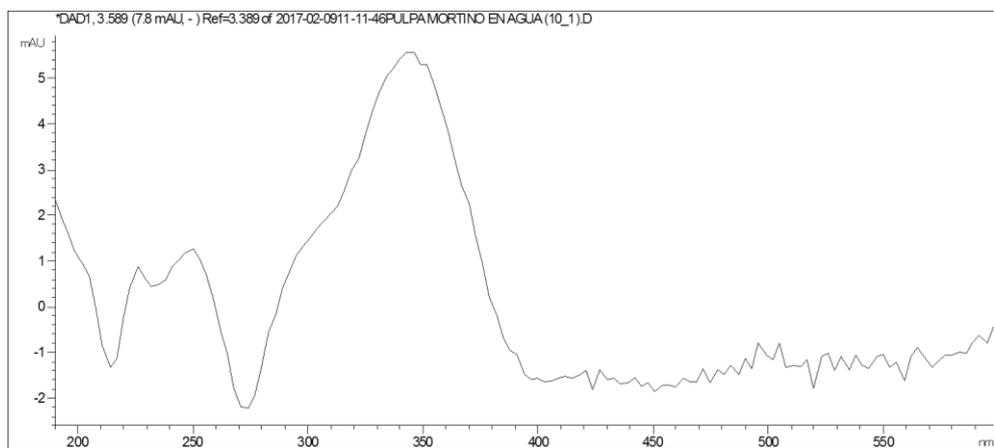


Gráfico 37. Tiempo 3.589 desconocido 7

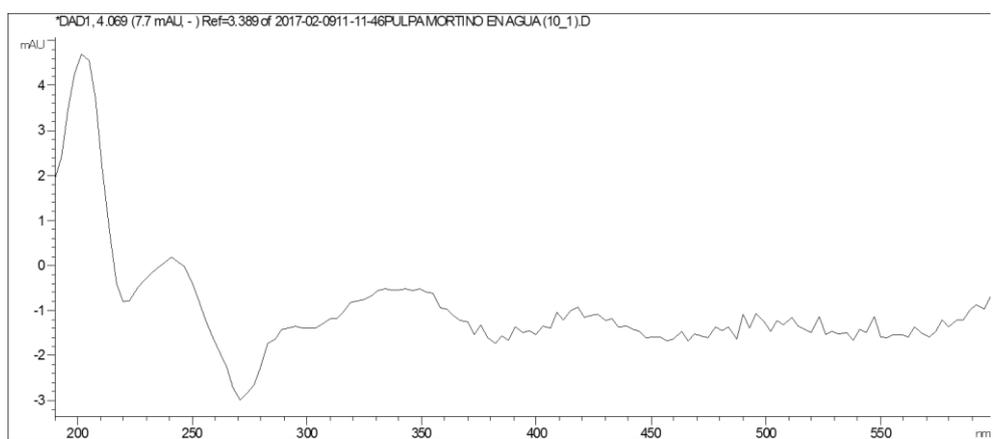


Gráfico 38. Tiempo 4.069 desconocido 8