

## Cultivo *in vitro* del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

María L. Torres P.<sup>1\*</sup>, Diana Trujillo P.<sup>1</sup>, Venancio Arahana B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad San Francisco de Quito  
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador

\*Autor principal/Corresponding author, e-mail: ltorres@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: S. de la Torre, Ph.D.

Recibido/Received: 02/25/2010. Aceptado/Accepted: 04/01/2010.

Publicado en línea/Published on Web: 05/21/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

### Abstract

Due to the economic and agronomic potencial that mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) has in Ecuador, the objective of this research was to establish *in vitro* propagation methods for this species by seed germination and by shoot growth from axillary buds. Modified Woody Plant Medium [1] (mWPM) was used, in which up to 60.7 % of seeds germinated. A strong cytokine, trans-zeatin riboside, TZR (1 mg/l), combined with  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid, NAA (0.05 mg/l), was used to subculture the *in vitro* germinated plantlets. The use of basal medium without hormones or with 2iP, 6-( $\gamma$ , $\gamma$ -dimethylalilamino) purine, allowed elongation and rooting of plantlets. The acclimatization of mortiño plants has not yet been standardized, and further research is needed to find the conditions that are suitable for this process. To establish *in vitro* cultures by axillary buds, apical segments of the stem were disinfected and introduced in medium mWPM containing TZR, (7 mg/l) combined with NAA (0.1 mg/l). Growing buds were transferred to media with 2iP (3 or 5 mg/l) for propagation and elongation. This investigation is a preliminary study for the *in vitro* culture of mortiño, setting the basis for future research with this species.

**Keywords.** trans-zeatin riboside (TZR), 6-( $\gamma$ , $\gamma$ -dimethylalilamino) purine (2iP), *Vaccinium floribundum* Kunth, *in vitro* germination, axillary buds.

### Resumen

Debido al potencial agrícola y económico que tiene el mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) para el Ecuador, esta investigación tuvo como objetivo establecer métodos de propagación *in vitro* de esta especie como germinación de semillas y brotación de yemas axilares. Se utilizó un medio basal sin hormonas, Woody Plant Medium [1] modificado (mWPM), en el que las semillas germinaron con hasta un 60.7 % de eficiencia. Para el subcultivo de plántulas germinadas *in vitro*, se usó una citoquinina fuerte, la trans zeatina ribósido, TZR (1 mg/l) en combinación con ácido  $\alpha$ -naftalenacético, NAA (0.05 mg/l). El medio basal sin hormonas o con 2iP, 6-( $\gamma$ , $\gamma$ -dimetilalilamino) purina, permitió la elongación de las plántulas germinadas *in vitro* y su enraizamiento. La aclimatación de las plantas de mortiño cultivadas *in vitro* aún no está estandarizada y se requiere mayor investigación para encontrar los factores necesarios para completar satisfactoriamente este proceso. Para la introducción *in vitro* de yemas axilares se desinfectaron los extremos apicales de tallos de mortiño, y se los introdujo en medio mWPM suplementado con TZR (7 mg/l) en combinación con NAA, (0.1 mg/l). Las yemas brotadas se subcultivaron en medios que contenían 2iP (3 ó 5 mg/l) para su propagación y elongación. Esta investigación representa un estudio piloto para el cultivo *in vitro* del mortiño, sentando las bases para futuras investigaciones con esta especie.

**Palabras Clave.** trans zeatina ribósido (TZR), 6-( $\gamma$ , $\gamma$ -dimetilalilamino) purina (2iP), *Vaccinium floribundum* Kunth, germinación *in vitro*, brotación de yemas axilares.

### Introducción

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) es una fruta de la familia de las Ericáceas que crece en forma silvestre en los páramos o zonas húmedas de las montañas de Ecuador y Colombia, entre 1400 hasta 4350 msnm de altitud. Es un arbusto pequeño que excepcionalmen-

te puede alcanzar 3.5 m de altura, y la fruta es una baya esférica azul de menos de 1cm de diámetro, con sabor agridulce [2] (Figura 1). En Ecuador y Colombia, el mortiño es utilizado en mermeladas y en pastelería [3]. En Ecuador es conocido por su uso en la preparación de la colada morada, bebida típica del Día de los Difuntos [2]. Los frutos de *Vaccinium* contienen cantidades al-

ISSN 1390-5384



tas de vitamina C, pectina, celulosa y antocianinas, las cuales tienen propiedades antioxidantes, antitumorales, antiulcerales y antiinflamatorias [4].

A pesar de tener propiedades alimenticias y medicinales, no se ha fomentado el cultivo del mortiño en Ecuador, y los frutos que se venden en los mercados locales se obtienen de plantas silvestres [2]. En noviembre del 2008, la caja de mortiño se vendió por 40 dólares [5]. Con una tecnología adecuada, esta fruta podría competir a nivel mundial con otras frutas como el arándano y el *lingonberry* que son las versiones norteamericanas y europeas del mortiño [2]. Se ha investigado poco acerca de esta planta andina pero su potencial uso la convierte en una especie de interés para el desarrollo agrícola de variedades locales en el país.

El cultivo *in vitro* de plantas comprende una serie de técnicas o herramientas para la propagación y mejoramiento de especies vegetales [6]. Determinar el medio de cultivo apropiado y los balances hormonales que promuevan la proliferación y diferenciación celular es básico para aprovechar las potencialidades de las técnicas *in vitro*. El medio de cultivo que se usa comúnmente para la propagación de *Vaccinium* es el Woody Plant Medium (WPM), o modificaciones de éste, el cual ha sido desarrollado específicamente para plantas leñosas [1], que suelen ser sensibles a las concentraciones altas de sal. En cuanto a los balances hormonales, se ha observado que *Vaccinium* requiere de citoquininas para su proliferación celular, y comúnmente son usadas la zeatina y el 2iP [7, 8, 9].



Figura 1: Hojas y frutos de una planta silvestre de mortiño. Barra: 1 cm.

Hay pocos estudios sobre germinación *in vitro* de semillas de *Vaccinium* [10, 11, 12], y la forma de propagación *in vitro* más usada es el establecimiento de cultivos a partir de yemas axilares [4, 7].

Este estudio tuvo como objetivo establecer protocolos *in vitro* para la germinación de semillas, brotación de yemas axilares y micropropagación del mortiño, como una contribución al fomento del cultivo y mejoramiento de esta especie en el país.

## Metodología

### Material Vegetal

Las semillas de mortiño para las pruebas de germinación se obtuvieron de frutos comprados en mercados locales de Quito. Las plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro* sirvieron para los ensayos de subcultivo. Para los ensayos de brotación de yemas axilares *in vitro* se usaron tallos de mortiño recolectados en el páramo de las provincias de Pichincha (Pasocha) y Cotopaxi, donde el mortiño crece de forma silvestre.

### Germinación *in vitro* de semillas de mortiño

Para las pruebas de germinación se usaron dos medios de cultivo Woody Plant Medium (WPM)[1] modificado (mWPM), y Murashige & Skooge (MS) [13] con la mitad de concentración de sales (1/2 MS) (Tabla 1).

Para la desinfección de las semillas, éstas fueron sumergidas en alcohol al 70 % por tres minutos, luego fueron lavadas con agua destilada estéril y desinfectadas por 10 minutos en hipoclorito de sodio (2.5 % con 4 gotas de Tween 20).

	mWPM	MS	1/2 MS	WPM
<b>Macronutrientes (mg/l)</b>				
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	***	***	***	684
KNO <sub>3</sub>	392	1900	950	190
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	540	1650	825	400
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	85	170
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	368	440	220	***
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	370	370	185	370
<b>Micronutrientes (mg/l)</b>				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2	3.1	6.2
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.0125	0.025
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.0125	0.25
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	22.3	22.3	11.15	22.3
KI	0.83	0.83	0.415	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.125	0.25
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8.6	8.6	4.3	8.6
<b>Elementos Orgánicos (mg/l)</b>				
Ácido nicotínico	0.5	0.5	0.25	0.5
Tiamina	0.1	0.1	0.05	0.1
Piridoxina	0.5	0.5	0.25	0.5
Myo-inositol	100	100	50	100
Glicina	***	***	***	2
<b>Quelato de Hierro (mg/l)</b>				
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	13.9	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	37.2	37.2	18.6	37.2
Azúcar: 20 g/l	***	***	***	***
Agar: 5.8 g/l	***	***	***	***
pH: 5.2	***	***	***	***

Tabla 1: Composición de medios de cultivo usados para la propagación *in vitro* del mortiño

Finalmente, las semillas fueron lavadas 5 veces con agua destilada estéril y sembradas en frascos con medio 1/2 MS o mWPM sin hormonas. Con la intención de evaluar el efecto de la luz y la temperatura sobre la germinación de las semillas, algunos frascos fueron cultivados bajo un fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, otros en oscuridad total, y algunos recibieron tratamiento de frío a 4 °C por dos semanas.

### Subcultivo de plántulas de mortiño

Para el subcultivo de plántulas de mortiño obtenidas de semillas germinadas *in vitro*, se usó el medio basal

Citoquininas		Giberelina		Auxinas
BAP	TZR	2iP	GA3	NAA
***	***	***	1 - 10	***
**	***	***	5 - 10	0.02
1	***	***	***	***
1	***	***	5 - 10	***
0.5 - 3	***	***	5 - 10	0.01 - 0.04
1 - 10	***	***	***	0.01 - 0.05
**	0.5 - 7	***	***	***
**	1 - 2	***	10	***
**	1	***	***	0.05
**	1	1 - 5	***	***
**	1	1 - 5	***	0.05
**	***	1 - 5	***	***
**	***	1 - 5	***	0.05-0.1

**Tabla 2: Combinaciones de hormonas utilizadas para la propagación de plántulas de mortiño obtenidas a partir de semillas germinadas in vitro**

mWPM y diferentes combinaciones de hormonas que se describen en la Tabla 2. Para promover elongación de las plantas, se probaron diferentes concentraciones de GA<sub>3</sub> solo o en combinación con NAA. Para procurar el engrosamiento del tallo y la ramificación de la plántula, se usó una citoquinina (2iP, BAP, o TZR) sola o en combinación con una auxina o giberelina. En los ensayos iniciales de propagación, se probó BAP, GA<sub>3</sub> y NAA, solos o en combinación. A fin de determinar el efecto de TZR sobre la propagación del mortiño, se probó TZR solo, combinado con GA<sub>3</sub> o con NAA en plántulas provenientes de semillas germinadas in vitro, en segmentos de tallo y en plantas ya subcultivadas anteriormente en TZR. La combinación de TZR (1 mg/l) y NAA (0.05 mg/l) se usó durante el resto de la investigación para una propagación continua de material vegetal necesario para otros ensayos. Finalmente, para obtener una mejor elongación y ramificación de las plántulas de mortiño se analizó el efecto del 2iP en plántulas que habían sido cultivadas previamente en TZR y NAA. Se usó 2iP solo, o con TZR y NAA.

#### **Introducción in vitro y brotación de yemas axilares de mortiño**

Se usaron los extremos apicales de ramas jóvenes de mortiño silvestre, los cuales fueron lavados con agua de la llave por tres a cinco minutos.

Luego se removieron todas las hojas con una tijera. Se cortaron segmentos de tallo, de 5 cm de largo, incluyendo cinco o más yemas axilares, que fueron sumergidos por tres minutos en alcohol al 70 % y luego lavados con agua destilada estéril. Posteriormente se los sumergió en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5 % con 3 ó 4 gotas de Tween 20, por 10 a 12 minutos, se hicieron tres lavados con agua destilada estéril.

Se usó el medio basal mWPM con reguladores de crecimiento (Tabla 3) para la brotación de las yemas. Al principio se colocaron cinco explantes por frasco de 477 ml, pero debido a contaminación cruzada resultó más conveniente poner explantes individuales en frascos de 4 ml. Los brotes obtenidos se subcultivaron en medios mWPM, 1/2 MS y MS, para promover su elongación y enraizamiento. Se los incubó a 23 °C, con fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad.

Citoquininas		Auxinas	
BAP	TZR	2iP	NAA
<b>Introducción</b>			
***	***	***	3
1 - 5	***	***	***
5	***	***	0.02
**	0.5	***	***
**	1 - 7	***	0.05 - 0.5
**	1 - 7	***	0.1
**	***	1 - 5	***
**	***	1 - 5	0.05 - 0.1
<b>Subcultivo</b>			
***	***	3 - 5	***
**	***	3 - 5	0.1

**Tabla 3: Combinaciones de hormonas utilizadas para la propagación in vitro de mortiño a partir de yemas axilares**

#### **Elongación, enraizamiento y aclimatación de plántulas de mortiño**

Las plántulas de mortiño desarrolladas bajo condiciones in vitro, fueron sometidas a pruebas de enraizamiento y elongación. Se probaron diferentes combinaciones de hormonas en medio basal mWPM. Para inducir elongación se probó GA<sub>3</sub> (1 a 5 mg/l) y BAP (3 mg/l) con NAA (0.02 mg/l), en tanto que para inducir enraizamiento se probó IBA (1 a 5 mg/l) y NAA (0.02 a 5 mg/l). Los medios basales mWPM, 1/2 MS y WPM (Tabla 1) sin reguladores de crecimiento también fueron probados para la elongación y enraizamiento de las plántulas.

Para la aclimatación de las plántulas se utilizaron frascos de vidrio que en su interior contenían macetas de cerámica rellenas de tierra y que fueron esterilizados en autoclave a 121 °C por una hora. Se escogieron las plántulas de mejor aspecto y con un sistema de raíces bien desarrollado. Se las extrajo del medio de cultivo, se removió el agar de las raíces así como las hojas café y/o callo en la base de las plántulas y se las sembró en los frascos de aclimatación que fueron tapados con papel plástico. Las plantas fueron mantenidas bajo un fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad a 23 °C. Después de 1 a 4 semanas se empezó a retirar progresivamente la cubierta plástica del frasco hasta retirarla completamente en las dos semanas subsiguientes, para reducir paulatinamente la humedad relativa interna y procurar la adaptación de las plántulas al medio ambiente natural. Las plantas que sobrevivieron fueron transferidas a fundas de plástico negro con tierra tipo I de Multiflor (tierra especial para orquídeas), Agrotterra (tierra que se comercializa para cultivos en general), tierra del Paschoa, de la misma localidad donde se recolectaron las plantas de mortiño (Paschoa), o una mezcla de turba mas perlita comercial (Sunshine All Purpose Planting Mix ) mezclada con tierra del Paschoa.

## **Resultados y Discusión**

### **Germinación in vitro de semillas de mortiño**

El medio de cultivo Woody Plant Medium modificado (mWPM) fue el adecuado para la germinación de semillas y subsiguiente cultivo de plántulas de mortiño. Este medio se formuló emulando la composición de macronutrientes de WPM [14], en tanto que se mantuvo sin

cambios las concentraciones de micronutrientes. El pH del medio fue 5.2 y la concentración de sacarosa de 20 g/l [15, 16, 17].

Se observaron diferencias en los porcentajes de germinación de las semillas entre los diferentes tratamientos (Tabla 4). El porcentaje más alto, 60.7 %, se dio en semillas sembradas en mWPM con luz (fotoperíodo 16/8) y con tratamiento de frío (4 °C por dos semanas). La luz parecería ser el factor determinante en las diferencias de los porcentajes de germinación (15 % de diferencia entre los promedios de germinación con tratamientos de luz y oscuridad), lo cual concuerda con reportes que indican requerimientos de luz de ciertas especies para germinar, y que implicaría activación de genes inducidos por el fitocromo [18]. En cambio, no hubo diferencias en el tiempo requerido por las semillas para germinar; así, sin importar el tratamiento, las semillas germinaron en aproximadamente 20 días y las primeras hojas aparecieron a los 30 días de iniciado el ensayo. El porcentaje de germinación de semillas de mortiño obtenido en este estudio es relativamente bajo, en comparación con un estudio en *lingonberry* y *milberry* [12], en el que se obtuvo un 90 % de germinación de semillas después de 2 semanas. La diferencia del porcentaje de germinación in vitro entre estas especies puede ser atribuida a que se trata de especies distintas que responden de diversas formas a este tipo de cultivo.

#### **Subcultivo del mortiño**

Para el subcultivo de plántulas de mortiño obtenidas a partir de semillas germinadas in vitro, se probaron diferentes concentraciones y combinaciones de hormonas ya que las plántulas no se ramificaban en medio basal.

Plántulas de mortiño subcultivadas en mWPM suplementado con TZR (1 mg/l) + NAA (0.05 mg/l), ramificaron abundantemente. Después de varios subcultivos de estas plantas, la rapidez de ramificación y de crecimiento aumentó y en algunos casos el aspecto de la planta mejoró (Figura 2).

En los experimentos realizados se observó que a concentraciones bajas de 2iP (1 mg/l), las plántulas elongaron normalmente, mientras que concentraciones más altas de este regulador (5 mg/l), indujeron abundante ramificación pero inhibieron la elongación de las plántulas. Las plántulas crecidas en medio de cultivo suplementado con 3 mg/l de 2iP tuvieron moderada elongación, con aspecto robusto.

En otros casos, utilizando medio de cultivo mWPM suplementado con varias concentraciones de GA<sub>3</sub> (1-10 mg/L) (Tabla 2), las plántulas se elongaron, pero no se ramificaron, y adquirieron una consistencia delgada y débil.

En medio de cultivo suplementado mWPM con BAP + NAA + GA<sub>3</sub> y TZR + GA<sub>3</sub> (Tabla 2), las plántulas de mortiño ramificaron poco, algunas formaron callo en la base del tallo y otras formaron raíces aéreas. Esto concuerda con los resultados de un estudio realizado con



**Figura 2:** Plántulas de mortiño, a las 8 semanas cultivo en mWPM suplementado con TZR-1 mg/l + NAA-0.05 mg/l, (23°C, fotoperíodo 16/8).

*bilberry* y *lingonberry* [12] utilizando BAP y NAA en el que no se lograron establecer cultivos in vitro de estas especies pues las plantas en general no presentaban un buen aspecto. En otro estudio [15] los autores observaron que el GA<sub>3</sub> tenía un efecto negativo para la multiplicación de *Vaccinium*.

Se conoce que tanto 2iP como TZR son citoquininas que probablemente reducen la dominancia apical fuerte que es característica de varias especies de *Vaccinium*, permitiendo así el desarrollo de las yemas axilares [8, 19]. Los protocolos de cultivo in vitro de *Vaccinium* reportados en la literatura científica [4, 7, 12, 20] no fueron totalmente aplicables al mortiño y fue necesario optimizar el medio y las combinaciones hormonales para el cultivo in vitro de esta especie. Este estudio demostró que el medio mWPM suplementado con TZR (1 mg/l) y NAA (0.05 mg/l), es el adecuado para el subcultivo de plántulas de mortiño, especialmente si se quiere promover abundante ramificación para usarlas como fuente de explantes para su posterior micropropagación. González et al. [15], reportaron resultados similares: abundante ramificación con inhibición de elongación al utilizar zeatina. Por otro lado, se obtuvieron plántulas elongadas y robustas cuando se utilizaron medios de cultivo suplementados con 2iP (3 mg/l).

#### **Introducción in vitro y brotación de yemas axilares de mortiño**

El protocolo de desinfección utilizado no permitió erradicar totalmente la contaminación de los tallos introducidos in vitro (40 % de contaminación). Tetsumura et al. [16] también observaron un porcentaje de contaminación de hasta 40 %, utilizando explantes de plantas de blueberry mantenidas en un espacio abierto. Los explantes de mortiño se obtuvieron de plantas silvestres que estaban creciendo en su hábitat natural, lo cual podría explicar el alto porcentaje de contaminación que se observó. Entonces, la estrategia recomendada es colocar los explantes individualmente en frascos de 4 ml, para evitar la contaminación cruzada entre ellos.

De las combinaciones hormonales probadas en medio mWPM, la mezcla de 7 mg/l de TZR + 0.1 mg/l de NAA

Medio	Tratamiento utilizado	Tratamiento utilizado	Semillas Sembradas/ Semillas Germinadas	Germinación (%)
BAP	TZR	2iP	GA <sub>3</sub>	NAA
1/2 MS	Luz	*****	229/98	42.8 (%)
mWPM	Luz	*****	1713/948	55.3 (%)
mWPM	Oscuridad	*****	147/66	44.9 (%)
mWPM	Luz	4°C	433/263	60.7 (%)
mWPM	Oscuridad	4°C	102/41	40.2 (%)

Tabla 4: Porcentaje de germinación de semillas de mortiño según el medio y tratamientos utilizados

fue la que mejores resultados dio en la brotación de yemas (100 %) (Figura 3). También se vio brotación de yemas usando 1 y 5 mg/l de TZR con 0.1 mg/l de NAA. Sin embargo, al reducir la concentración de NAA a 0.05, no hubo brotación a pesar de mantener las concentraciones de TDZ fijas (1-7 mg/l). Esto indica la importancia de la interacción y balance citoquinina/auxina en la inducción de procesos de crecimiento y diferenciación *in vitro*.

En medio mWPM suplementado con 2iP con o sin NAA (Tabla 3), las yemas brotaron únicamente en 2iP - 5 mg/l, aunque con una eficiencia menor que en medios que contenían TZR y NAA.

En medios de cultivo suplementados con BAP solo o en combinación con NAA (Tabla 3), no hubo respuesta.

La auxina NAA, sola (3 mg/l), también indujo brotación de yemas, pero las plántulas presentaron anomalías y apareció callo en la base del tallo.

En cualquier caso, solo fue exitosa la brotación de yemas axilares al usar explantes extraídos de la parte apical del tallo.

Dado que los brotes obtenidos de yemas en medios suplementados con TDZ 7 mg/l + NAA 0.1 mg/l, crecían muy lentamente, fue necesario transferirlos a medios mWPM suplementados con 2iP, con o sin NAA (Tabla 3). En estos medios sobrevivieron la mayoría de plántulas, se ramificaron y crecieron normalmente. Particularmente en 3 y 5 mg/l de 2iP, sin NAA, las hojas tenían un color verde de aspecto saludable. Hay varios estudios con *Vaccinium* en los que el cultivo se estableció en medios con zeatina y posteriormente se pasó a medios con 2iP para la elongación ya que 2iP puede producir efectos tóxicos en los explantes nuevos [8, 15, 20, 21]. Las yemas necesitan concentraciones altas de citoquininas para brotar [21], lo cual podría explicar la necesidad de usar TZR en los pasos iniciales de introducción *in vitro* del mortiño.

Las plántulas subcultivadas en medios 1/2 MS y mWPM sin reguladores de crecimiento se elongaron pero se observó poco enraizamiento, mientras que en medio MS se tornaron rojas y no crecieron.

#### **Elongación, enraizamiento y aclimatación de plántulas de mortiño**

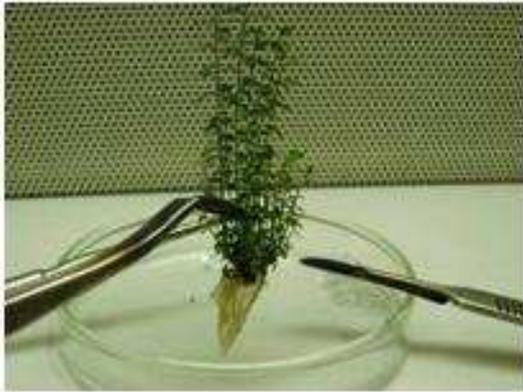
Plántulas de mortiño subcultivadas en mWPM suple-

mentado con BAP + NAA o GA<sub>3</sub>, al principio se elongaron, pero eventualmente se tornaron café y murieron. En los subcultivos con mWPM + IBA (1, 3 ó 5 mg/l), se obtuvo un porcentaje de enraizamiento de hasta el 60 %, pero las raíces eran aéreas y escasas (Tabla 4). Posteriormente, se subcultivaron plántulas de mortiño en medios mWPM y 1/2 MS, donde crecieron considerablemente y muchas tenían raíces en la base de la planta, otras presentaron raíces aéreas y en algunas se observaron raíces de los dos tipos. Las plántulas con raíces en la base del tallo tenían un aspecto robusto, con hojas de 3 mm de tamaño, y muchas de ellas fueron usadas en ensayos de aclimatación (Figura 4). En WPM hubo escasa formación de raíces con moderada elongación de la plántula.

Según la literatura científica, para varias especies de *Vaccinium*, se lleva a cabo un proceso de aclimatación que dura entre 2 semanas a 2 meses [8, 22]. En la aclimatación del mortiño, sin embargo, algunas plantas murieron durante el proceso antes de ser transferidas a fundas plásticas con tierra, mientras otras se contaminaron y murieron. Al pasar las plantas que sobrevivieron a fundas plásticas, la mayoría murieron enseguida o en las siguientes semanas. Esto se debió probablemente a que las raíces eran delgadas y varias de ellas aéreas, lo que sugiere que posiblemente no eran funcionales. Se debe investigar todavía las condiciones adecuadas de la aclimatación de plantas de mortiño cultivadas *in vitro* para lograr su traslado al campo.



Figura 3: Brotación de yemas axilares de mortiño cultivadas en mWPM suplementado con TZR - 7 mg/l + NAA - 0.1 mg/l, a las 10 semanas de cultivo (23°C, fotoperíodo 16/8)



**Figura 4:** Plántula de mortiño enraizada, a las 16 semanas de cultivo en medio 1/2 MS sin hormonas (3°C, fotoperíodo 16/8)

### Conclusiones

En este trabajo se proponen varias estrategias que pueden ser utilizadas para el establecimiento del cultivo *in vitro* del mortiño. Por un lado, se demostró que es posible la germinación de semillas *in vitro* y el posterior crecimiento de plántulas, a través de subcultivos en medios de cultivo con reguladores de crecimiento. También se describe un método para la introducción *in vitro* de yemas axilares, donde fue necesario una alta concentración de citoquininas, particularmente TZR, para iniciar el crecimiento. Es necesario seguir trabajando en la aclimatación de las plántulas producidas *in vitro* para su adecuado traslado al campo. Este trabajo representa un estudio pionero en el mortiño con la intención de conocer mejor su comportamiento *in vitro* y lograr en un futuro un manejo más controlado de su cultivo.

### Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración del grupo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito en la realización de esta investigación. Un gracias especial a Diana Ayala por sus contribuciones en la escritura de este artículo.

### Referencias

- [1] Lloyd, G., and McCown, B. 1980. "Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture." *Comb. Proc. Intl Plant Prop. Soc.* 30, 421–427.
- [2] Asturizaga, A. S., Øllgaard, B., and Balslev, H. 2006. "Frutos comestibles." *Botánica Económica de los Andes Centrales.* 329–346.
- [3] Luteyn, J. L. 2002. "Diversity, adaptation, and endemism in neotropical ericaceae: Biogeographical patterns in the Vaccinieae." *The Botanical Review.* 68, 55–87.
- [4] Debnath, S. C. 2006. "Propagation of *Vaccinium* *in vitro*: A review." *International Journal of Fruit Science.* 6, 47–71.
- [5] Grupo El Comercio (eds.) Noviembre 2008. "El mortiño es un apetitoso regalo de la tierra de la serranía de Ecuador." *Revista Líderes.* 3, 17.
- [6] Taji, Acram, P. K. and Lackshmanan, P. 2002. *In vitro Plant Breeding.* 1–4.
- [7] Debnath, S. C. 2004. "In vitro culture of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.)" *Small Fruits Review.* 39, 393–408.
- [8] Debnath, S. C. and McRae, K. B. 2001. "In vitro culture of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* l.): The influence of cytokinins and media types on propagation." *Small Fruits Review.* 1, 3–19.
- [9] Ostrolucká, M., Libiaková, G., Ondrušková, E., and Gajdošová, A. 2004. "In vitro propagation of *Vaccinium* species." *Acta Universitatis Latviensis, Biology.* 676, 207–212.
- [10] Debnath, S. C. 2003. "Improved shoot organogenesis from hypocotyl segments of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* l.)" *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 39, 490–495.
- [11] Pereira, J. M. 2006. "Conservation of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae) by micropropagation using seedling nodal explants." *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 42, 65–68.
- [12] Jaakola, L., Tolvanen, A., Laine, K. and Hohtola A. 2001. "Effect of N6-isopentenyladenine concentration on growth initiation *in vitro* and rooting of bilberry and lingonberry microshoots." *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 66, 73–77.
- [13] Murashige, T. and Skoog, F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures." *Physiol. Plantarum.* 15, 473–497.
- [14] Rowland, L. J. and Ogden, E. L. 1992. "Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf sections of highbush blueberry." *HortScience.* 27, 1127–1129.
- [15] González, M. V., López, M., Valdez, A. E., and Ordas, R. J. 2000. "Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from fieldgrown plants." *Ann. appl Biol.* 137, 073–078.
- [16] Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K., Komatsu, H., Sugimoto, Y., and Kunitake, H. 2008. "Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars." *Scientia Horticulturae.* 1–3.
- [17] Cao, X., Fordham, I., Douglass, L., and Hammerschlag, F. A. 2003. "Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from *in vitro* propagated highbush blueberry shoots." *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 75, 255–259.
- [18] Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology.* Sunderland, Ma. Sinauer Associates, Inc. Publishers. 483–516.
- [19] Debnath, S. C. and McRae, K. B. 2001. "An efficient *in vitro* shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) by axillary bud proliferation." *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 37, 243–249.
- [20] Reed, B. M. and Abdelnour-Esquivel, A. 1991. "The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars." *HortScience.* 26, 1320–1322.
- [21] Eccher, T. N., Noé, N. 1989. "Comparison between 2ip and zeatin in the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*)." *Acta Horticulturae.* 241, 185–190.

- [22] Noé, N., Eccher, T. N. 1994. "Influence of irradiance on in vitro growth and proliferation of *Vaccinium corymbosum* (highbush blueberry) and subsequent rooting in vivo." *Physiologia Plantarum*. 91, 273–275.