

Universidad San Francisco de Quito

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

Diana Trujillo

B.S. en Biotecnología

Quito, Mayo 2008

**Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

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

Diana Trujillo

María de Lourdes Torres, Ph.D.
Directora del Proyecto

María de Lourdes Torres, Ph.D.
Miembro del Comité

Venancio Arahana, Ph.D.
Miembro del Comité

Stella de la Torre, Ph.D.
Decana del Colegio

Quito, Mayo del 2009

Derechos de Autor

© Derechos de autor
Diana Trujillo
2009

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia
por apoyarme durante toda mi vida,
por darme la oportunidad de realizar mis
estudios,
y por tener confianza en que alcanzaría mi
objetivo.

Resumen

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) es una baya que crece en los páramos de Ecuador. Podría comercializarse y crearse un nicho en el mercado para ésta, pero solo crece de forma silvestre, por lo que sería beneficioso optimizar la propagación de esta planta. En este trabajo se estableció el cultivo *in vitro* por germinación de semillas y por brotación de yemas axilares.

Las semillas germinaron después de 2 semanas en un medio basal sin hormonas, Woody Plant Medium (Lloyd & McCown, 1980) modificado. Se obtuvo ramificación abundante mas no elongación de la planta al usar una citoquinina fuerte, la trans zeatina ribósido, TZR, (1mg/l) en combinación con ácido-naftalenacético, NAA, (0.05mg/l). El medio basal sin hormonas o con 2iP, 6-(gamma,gamma-dimetilalilamino)purina, permitieron la elongación de las plantas y su enraizamiento. La aclimatación de las plantas de mortiño todavía está en proceso, investigando una posible falta de raíces funcionales. Para la introducción *in vitro* de yemas axilares se usó los extremos apicales de tallos y TZR (7mg/l) en combinación con NAA, (0.1mg/l), subcultivando las yemas brotadas a medios con 2iP (3 ó 5 mg/l) para su elongación y propagación. No se obtuvo regeneración de retoños adventicios usando hojas introducidas o provenientes de plantas *in vitro*. Se encontró varias combinaciones de hormonas que indujeron callo y otras para crecimiento de callos.

En esta investigación se desarrolló protocolos para el cultivo *in vitro* del mortiño, sentando las bases para futuras investigaciones con esta especie.

Abstract

Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) is a fruit that grows in the high altitude mountain regions of Ecuador. It has the potential to be commercialized and a niche in the market could be created, but it only grows in the wild. Therefore, it would be beneficial to optimize the propagation of this plant. In this study, mortiño *in vitro* cultures were established from seeds and by axillary bud growth.

Seeds germinated after 2 weeks in a basal medium, modified Woody Plant Medium (Lloyd & McCown, 1980), without hormones. A strong cytokine, trans-zeatin riboside, TZR (1mg/l), combined with naphthaleneacetic acid, NAA (0.05mg/l), allowed abundant branching but inhibited elongation of the plant. The use of basal medium without hormones or with 2iP, 6-(gamma,gamma-dimethylalylamino) purine, allowed elongation and rooting of plants. Acclimatization of mortiño plants is still being investigated, focusing on the lack of a functional root system. To establish cultures by axillary buds, apical segments of the stem and TZR, (7mg/l) combined with NAA, (0.1 mg/l) were used and growing buds were transferred to media with 2iP (3 or 5 mg/l) for elongation and propagation. Regeneration of adventitious buds, using introduced leaves or leaves from *in vitro* plants, was not achieved. Various combinations of hormones that induced callus or permitted callus growth were found.

In this investigation, protocols for the *in vitro* culture of mortiño were established, thus setting the basis for future research with this species.

TABLA DE CONTENIDOS

DERECHOS DE AUTOR	3
DEDICATORIA	¡Error! Marcador no definido.
RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.
ABSTRACT	¡Error! Marcador no definido.
1. Introducción	¡Error! Marcador no definido.
1.1. El género <i>Vaccinium</i> y el mortiño.....	¡Error! Marcador no definido.
1.2. Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos	¡Error! Marcador no definido.
1.2.1. Generalidades	2
1.2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Vaccinium</i>	2
1.2.2.1. Germinación de semillas de <i>Vaccinium in-vitro</i>	3
1.2.2.2. Propagación <i>in-vitro</i> de <i>Vaccinium</i>	4
1.2.2.3. Introducción <i>in vitro</i> de yemas axilares de <i>Vaccinium</i>	5
1.2.2.4. Enraizamiento y aclimatación.....	6
1.2.2.5. Regeneración a partir de explantes	7
2. Objetivo General	¡Error! Marcador no definido.
3. Objetivos Específicos	9
4. Área de Estudio	9
5. Justificación	10
6. Materiales	12
6.1. Material Vegetal.....	12
6.2. Desinfección de semillas y tallos de mortiño.....	12
6.3. Propagación <i>in vitro</i> del mortiño	12
6.4. Aclimatación.....	13
6.5. Ensayos de regeneración.....	13
7. Metodología	¡Error! Marcador no definido.
7.1. Germinación <i>in vitro</i> semillas de mortiño.....	15
7.1.1. Obtención de semillas de mortiño	15
7.1.2. Desinfección de las semillas.....	15
7.1.3. Germinación de semillas de mortiño	16
7.1.4. Propagación de plantas de mortiño.....	16
7.2. Introducción <i>in vitro</i> de yemas axilares de mortiño.....	17
7.2.1. Obtención de los tallos de mortiño	17
7.2.2. Desinfección de los segmentos de tallos	17
7.2.3. Iniciación de cultivo <i>in vitro</i> de mortiño a partir de yemas axilares	18
7.3. Elongamiento, enraizamiento y aclimatación	19
7.3.1. Elongación y enraizamiento de plantas de mortiño <i>in vitro</i>	19
7.3.2. Observación al microscopio de cortes de tallo y raíces	20
7.3.3. Aclimatación de plantas de mortiño introducidas <i>in vitro</i> por semillas	20
7.4. Ensayos de regeneración y formación de callo a partir de explantes de hoja o tallo	21

7.4.1. Desinfección de hojas y tallos de plantas de mortiño recogidas en el campo	22
7.4.2. Pruebas de regeneración y formación de callo	22
7.4.2.1. Hojas y tallos introducidos <i>in vitro</i>	23
7.4.2.2. Hojas de plantas <i>in vitro</i>	23
7.4.2.3. Subcultivo de callos	23
8. Resultados	24
8.1. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de mortiño	24
8.1.1. Desinfección de las semillas.....	24
8.1.2. Germinación de semillas de mortiño	24
8.1.3. Propagación de plantas de mortiño.....	24
8.2. Introducción <i>in vitro</i> de yemas axilares de mortiño	27
8.2.1. Desinfección de los segmentos de tallos	27
8.2.2. Iniciación de cultivo <i>in vitro</i> de mortiño a partir de yemas axilares	27
8.3. Elongamiento, enraizamiento y aclimatación	29
8.3.1. Elongación y enraizamiento de plantas de mortiño <i>in vitro</i>	29
8.3.2. Observación al microscopio de cortes de tallo y raíces.....	30
8.3.3. Aclimatación de plantas de mortiño introducidas <i>in vitro</i> por semillas	30
8.4. Ensayos de regeneración y formación de callo a partir de explantes de hoja o tallo; Error! Marcador no definido.	
8.4.1. Desinfección de hojas y tallos de plantas de mortiño <i>ex vitro</i> ; Error! Marcador no definido.	
8.4.2. Pruebas de regeneración y formación de callo	32
8.4.2.1. Hojas y tallos introducidos <i>in vitro</i>	32
8.4.2.2. Hojas de plantas <i>in vitro</i>	32
8.4.2.3. Subcultivo de callos	34
9. Discusión.....	35
9.1. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de mortiño	35
9.2. Introducción <i>in vitro</i> de yemas axilares de mortiño	¡Error! Marcador no definido.
9.3. Elongamiento, enraizamiento y aclimatación	39
9.4. Ensayos de regeneración y formación de callo a partir de explantes de hoja o tallo	40
10. Conclusiones.....	41
11. Recomendaciones	42
12. Bibliografía	43
13. Tablas.....	46
14. Figuras	53

1. Introducción

1.1. El género *Vaccinium* y el mortiño

La familia de las Ericáceas contiene alrededor de 4500 especies (Asturizaga et al, 2006). En los neotrópicos, hay aproximadamente 800 especies de Ericáceas que se concentran en el área andina, especialmente en Colombia y Ecuador a alturas de 1000 y 3000 msnm. En esta área, la geografía característica y el elevado número de microclimas y nichos ecológicos contribuyeron a la evolución de diferentes formas de vida dentro de esta familia. En los Andes, estas especies se encuentran adaptadas, por lo general, a los ambientes húmedos y fríos de las montañas pero pueden tener formas de vida epifíticas, herbáceas, terrestres o arbustivas, entre otras (Luteyn, 2002).

El género *Vaccinium* L, uno de los géneros más grandes de la familia Ericaceae, comprende 400 a 450 especies distribuidas en todos los continentes excepto Australia y Antártida y, en el área de los Andes, hay alrededor de 40 especies (Asturizaga et al, 2006; Debnath *Propagation*, 2006). Las especies de *Vaccinium* crecen por lo general en suelos ácidos, arenosos, con turba o con materia orgánica. Producen frutas comestibles insípidas o de sabor dulce o agrio (Debnath *Propagation*, 2006). El cranberry, lingonberry y blueberry (*Vaccinium* spp.) fueron domesticados recién en el siglo veinte y son, económicamente, los cultivos más importantes del género *Vaccinium*. El mayor área de cultivo de estas tres especies es en Norteamérica, Europa y Asia (Debnath *Propagation*, 2006; Luteyn, 2002).

Las frutas de *Vaccinium* muchas veces tienen cualidades medicinales y contienen cantidades altas de vitamina C, pectina, celulosa y antocianinas. Estas últimas son compuestos que han mostrado tener propiedades antioxidantes, antitumorales, antiulcerales y antiinflamatorias (Debnath *Propagation*, 2006). Las hojas y frutos del lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*), por ejemplo, son usados para tratar enfermedades reumáticas y desórdenes estomacales, para bajar niveles de colesterol y como desinfectantes de vejiga y riñones (Debnath y McRae *In Vitro*, 2001). Por otro lado, el cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) contiene proantocianinas, las cuales ayudan a prevenir las infecciones de vías urinarias (Debnath y McRae, 2005).

Hay poca bibliografía en lo que respecta al uso de Ericáceas neotropicales, y es muy probable que no se esté apreciando o aprovechando el potencial medicinal y económico de estas plantas o sus frutas. En Ecuador y Colombia, la especie nativa más utilizada es el mortiño (*Vaccinium floribundum* L.), donde es utilizada en mermeladas y en pastelería

(Luteyn, 2002). El mortiño crece desde 1400 hasta 4350 msnm en los páramos o en zonas húmedas en las montañas. La fruta es una baya esférica de color azul oscuro y pequeña (de menos de 1cm de diámetro), con sabor fuerte y agrio. Estos frutos crecen en racimos de 6 a 10 frutos. El mortiño es un arbusto pequeño pero puede crecer hasta 3.5m de altura (Asturizaga et al, 2006).

El mortiño es muy común en los Andes y crece de forma silvestre en las montañas, pero no hay cultivos comerciales de éste. El fruto que se vende en los mercados locales o que se utiliza en reposterías se obtiene de plantas silvestres. En Ecuador es conocido más comúnmente por ser usado en noviembre en la preparación de la colada morada, bebida típica del Día de los Difuntos. La fruta es de fácil uso, ya que no necesita ser pelada, y puede ser consumida también en fresco o preparada dentro de diversos platos (Asturizaga et al, 2006). En noviembre del 2008, la caja de mortiño se vendió por 40 dólares (Revista Líderes, 2008).

1.2. Cultivo *in vitro* de tejidos

1.2.1. Generalidades

El cultivo de tejidos de plantas *in vitro* se refiere a una serie de técnicas en las que se cultivan plantas bajo condiciones controladas y libres de microorganismos. Entre los tipos de técnicas que abarca el cultivo *in vitro* de plantas están el rescate de embriones, el cultivo de protoplastos, el cultivo de callos y el cultivo de órganos, entre otros. Hoy en día, este conjunto de técnicas sirven como herramientas para la propagación y mejoramiento de plantas. La eficiencia en lograr estos propósitos y el tipo de resultado que se obtiene *in vitro* depende de varios factores que afectan el crecimiento de las plantas (Taji et al., 2002).

1.2.2. Cultivo *in vitro* de *Vaccinium*

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

que las plantas leñosas suelen ser sensibles a las altas concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo, por lo que Lloyd y McCown formularon el Woody Plant Medium (WPM) con concentraciones más bajas de ciertas sales (1980).

El medio de cultivo que se usa comúnmente en la propagación de *Vaccinium* es el WPM o modificaciones de éste (Debnath *Propagation*, 2006). Sin embargo, Tetsumura et al. (2008) investigaron el efecto de diferentes medios en la propagación y encontraron que, después de numerosos subcultivos, las plantas de blueberry propagadas en WPM empezaron a tornarse rojas, presumiblemente por una falta de nitrógeno o micronutrientes. En cambio, el medio Murashige Skoog (Murashige & Skoog, 1962), produjo vitrificación, posiblemente por un exceso de iones de amonio. Una mezcla de WPM y MS permitió un crecimiento óptimo.

Se ha llevado a cabo un gran número de estudios sobre la propagación *in vitro* de diversas especies del género *Vaccinium*. Se ha visto que la eficiencia de la propagación es influenciada por el balance y tipo de reguladores de crecimiento y por el tipo de medio de cultivo que se utiliza. En los estudios que se ha hecho con especies de *Vaccinium*, se reporta que las plantas producidas por el cultivo *in vitro* tienen un crecimiento vigoroso y superior en el campo frente a plantas propagadas por métodos tradicionales (Debnath *Propagation*, 2006).

1.2.2.1. Germinación de semillas de *Vaccinium in-vitro*

Hay poca literatura en lo que concierne a la germinación de semillas *in vitro* de *Vaccinium*. Estos estudios se han llevado a cabo en el lingonberry, *V. cylindraceum* y bilberry. En general, los protocolos de desinfección de semillas consisten en sumergirlas en etanol o un fungicida y luego desinfectarlas con hipoclorito de sodio (NaClO) a concentraciones de 0.6 hasta 3%, y Tween 20 por 10 hasta 25 minutos. Según el protocolo, las semillas desinfectadas se siembran directamente en el medio de cultivo, se remojan las semillas antes de ser puestas en el medio, o se lleva a cabo la germinación sobre papel filtro mojado. El tiempo de germinación varía entre 4 días a 2 semanas (Debnath, 2003; Pereira, 2006; Jaakola et al., 2001).

1.2.2.2. Propagación *in-vitro* de *Vaccinium*

Para la propagación de especies de *Vaccinium*, se suele utilizar cantidades bajas de sucrosa (Cao et al. 1998), y en un estudio en el *lowbush* blueberry se encontró que 20 g/l era la concentración que permitió una mejor propagación (Debnath, 2004). En cuanto al pH del medio, éste es un factor que puede afectar a la proliferación de retoños y la formación de raíces (Ostrolucká et. al 2004). Las especies de *Vaccinium* son acidofílicas y tanto en el blueberry (Ostrolucká et. al 2004), en el cranberry (Debnath, 2008) y en el lingonberry (Debnath *Influence of*, 2006) se suele usar medios de cultivo con pH bajo.

La zeatina o el 2iP, 6-(gamma,gamma-dimethylallylamino) purine, son usados en varios protocolos de propagación de especies de *Vaccinium* (Debnath & McRae *In Vitro*, 2001; Ostrolucká et. al, 2004). En un estudio con *V. cylindraceum* se usó medios con 2.5 y 5mg/l de 2iP para el crecimiento y multiplicación de semillas germinadas, aunque también se dio crecimiento en medio basal sin hormonas (Pereira, 2006). Para la multiplicación de lingonberry y milberry, Jaakola et al (2001) probaron dos medios: MS modificado con 2iP (5mg/l) o con BAP, 6-benzylaminopurine, (0.1mg/l) y NAA (0.05mg/l). Las semillas germinaron en ambos medios pero no se dio multiplicación en MS modificado con BAP y NAA mientras que en el medio con 2iP, se vio multiplicación después de 2 meses. En varios otros estudios se vio que no ocurría proliferación en la ausencia de citocininas (Debnath & McRae *In Vitro*, 2001; Ostrolucká et. al, 2004), presumiblemente por la influencia de una fuerte dominancia apical (Debnath, 2004).

La eficacia de las hormonas usadas en la fase de multiplicación generalmente varía según el cultivar o especie de *Vaccinium*. Así, no hay un consenso sobre una mayor eficacia de la zeatina o el 2iP para la producción de retoños de buena calidad (Debnath & McRae *In Vitro*, 2001; Ostrolucká et. al, 2004). En ciertos protocolos establecidos para la propagación se utiliza desde 0.2 mg/l hasta 4.4 mg/l de zeatina (Debnath *Influence of*, 2006; Tetsumura et al., 2008) ó 2.5 mg/l hasta 7.5 mg/l de 2iP (Debnath & McRae *In Vitro*, 2001; Noé et al., 1998). Un tratamiento común para la propagación del *blueberry* es la combinación de 5 mg/l de 2iP con 2 mg/l de zeatina (Cao et al., 1998; Cao & Hammerschlag, 2000).

En varios reportes, se logra la multiplicación y la elongación de *Vaccinium* en una misma fase (Debnath 2004; Gonzalez et al., 2000). Debnath (2004) encontró que la rapidez de multiplicación y la altura de retoños del *lowbush* blueberry aumentaba con la concentración

de zeatina. Gonzalez et al. (2000), en cambio, encontraron que no se dio elongación pero sí propagación en medios con zeatina. Los medios que contenían 5 mg/l de 2iP permitieron tanto elongación como propagación, de manera que determinaron que 2iP es mejor para la propagación. Debnath & McRae (*In Vitro*, 2001) encontraron que el tamaño, número de hojas y vigor era menor al utilizar zeatina en comparación con 2iP.

En las plantas leñosas, hay cierta tendencia de algunas especies de empeorar en su estado fisiológico después de varios subcultivos. Entre las anomalías que se presentan son la hiperhidricidad o una necrosis apical. Como resultado, la intensidad de proliferación se puede ver afectada a largo plazo (Gonzalez et al., 2000). Sin embargo, se ha visto que la rapidez de propagación de *Vaccinium* (Debnath & McRae *An efficient*, 2001), la altura de los retoños y vigor puede aumentar al hacer subcultivos (Debnath, 2004).

1.2.2.3. Introducción *in vitro* de yemas axilares de *Vaccinium*

Para la introducción *in vitro* de yemas en *Vaccinium*, hay varias estrategias que han sido probadas, incluyendo el uso de temperaturas bajas, oscuridad o intensidad de luz (Reed & Abdelnour-Esquivel, 1991). Sin embargo, la mayoría de reportes investigan el efecto del medio de cultivo o de reguladores de crecimiento en la introducción (Jaakola et al., 2001; Debnath, 2004).

La desinfección de los explantes en diversos estudios de establecimiento de *Vaccinium* consiste básicamente en un lavado superficial del tallo, seguido por la desinfección de los segmentos de tallo usando hipoclorito de sodio y finalmente, varios lavados con agua destilada estéril. Los segmentos de tallo se siembran en el medio de cultivo y hay 1 a 3 yemas axilares en cada segmento (Meiners et al., 2007; Reed & Abdelnour-Esquivel, 1991; Tetsumura et al., 2008).

Las hormonas más usadas para la introducción de *Vaccinium* son el 2iP y la zeatina. En investigaciones con *Vaccinium* no se acostumbra probar BAP en ensayos de iniciación a partir de yemas por ser inefectivo para este propósito (Jaakola et al., 2001). Usar 2iP solo, en muchos casos resulta ser muy fitotóxico, y da como resultado un porcentaje muy bajo de iniciación de retoños o crecimiento estancado (Reed & Abdelnour-Esquivel, 1991; Meiners et al., 2007). La eficacia de la hormona depende de la interacción entre el genotipo y la

citokinina pero, al comparar entre hormonas, la zeatina usualmente resulta superior al 2iP para la introducción de yemas (Debnath, 2004; Meiners et al., 2007; Reed & Abdelnour-Esquivel, 1991).

En un estudio de introducción de yemas, de 12 genotipos de *V. corymbosum*, la mayoría respondió mejor con 4mg/l de zeatina que con 10 ó 15 mg/l de 2iP. Reconociendo la alta variabilidad del género *Vaccinium*, para la iniciación de cultivos *in-vitro*, los autores recomiendan usar preliminarmente 4mg/l de zeatina y baja intensidad de luz a 25°C para luego ajustar las condiciones según la especie o genotipo (Reed & Abdelnour-Esquivel, 1991).

1.2.2.4. Enraizamiento y aclimatación

Durante el cultivo de plantas *in vitro*, las plantas crecen bajo condiciones que son óptimas para su crecimiento pero que conducen al desarrollo de anatomía, fisiología y morfología anormales. El sitio donde crecen generalmente tiene una humedad alta, baja cantidad de CO₂ e irradiación baja en comparación al campo. Una de las consecuencias es que las plantas no tienen estomas funcionales o suficiente cera epicuticular que permitan una regulación eficiente de la transpiración (Noé & Bonini, 1996). Además, el medio a menudo tiene reguladores de crecimiento y sucrosa como fuente de energía para la planta (Pospíšilová, 1999). En un estudio realizado en el blueberry, se vio que las hojas desarrolladas *in vitro* eran más pequeñas y delgadas, tenían una pérdida de agua más rápida y tenían forma diferente a hojas de plantas de blueberry del campo (Noé & Bonini, 1996).

Para el enraizamiento de plantas de *Vaccinium* se utiliza métodos para enraizar *in vitro* y *ex vitro*. Para el método *in vitro*, el procedimiento más común es colocar las plantas en medio basal sin hormonas durante 2 a 3 meses, logrando enraizamiento y elongación a la vez (Debnath & McRae *An efficient*, 2001; Pereira, 2006; Tetsumura, 2008).

Cuando se enraíza a las plantas de *Vaccinium* por métodos *ex vitro*, el procedimiento usual es sumergir la base de la planta en una solución de IBA, ácido indol-3-butírico, para luego colocar la planta en un sustrato. Éste generalmente contiene turba, perlita, y/o vermiculita y se coloca a la planta dentro de una cámara de humedad durante 1 a 4 meses hasta que enraícen las plantas (Noé & Eccher, 1994; Debnath & McRae *In Vitro*, 2001). Ya

que generalmente se obtiene un alto porcentaje de enraizamiento *ex vitro* (hasta 96% después de 8 semanas) algunos autores lo prefieren a enraizamiento *in vitro*, por razones económicas y prácticas (Debnath & McRae *In Vitro*, 2001; Jaakola et al., 2001; Pereira, 2006).

Después del enraizamiento se prosigue a la aclimatación, bajando la humedad durante un período de 2 semanas hasta 2 meses (Debnath & McRae *In Vitro*, 2001; Noé & Eccher, 1994). En la aclimatación de *Vaccinium*, es común observar un porcentaje de sobrevivencia muy elevado en las plantas que tienen raíz. En algunos casos, este porcentaje alcanza casi el 100% (Jaakola et al., 2001; Debnath & McRae *In Vitro*, 2001). En el campo y en el invernadero, se observa un desarrollo normal de las plantas de *Vaccinium* propagadas *in vitro* (Debnath & McRae *In Vitro*, 2001; Debnath & McRae *An efficient*, 2001).

1.2.2.5. Regeneración a partir de explantes

La regeneración se refiere a la formación de órganos adventicios que no estaban presentes en el explante desde un inicio (Pierik, 1987). La regeneración de embriones, raíces o retoños consiste en tres fases: de-diferenciación, inducción y el desarrollo de la estructura. En la de-diferenciación, el tejido se vuelve competente, generalmente por la presencia de una auxina. Si las células se vuelven competentes sin que ocurra división celular se trata de regeneración directa mientras que si ocurre formación de callo se trata de regeneración indirecta. En la segunda fase, de inducción, las células suelen recibir un estímulo hormonal específico que determine su vía de desarrollo. Finalmente, en la tercera fase, se empieza a desarrollar el órgano o embrión en ausencia o poca cantidad de hormonas (Klerk et al., 1997).

La regeneración de retoños puede servir para la producción de plantas modificadas genéticamente, para obtener variantes somaclonales y como un método de multiplicar especies de difícil propagación (Debnath, 2006). En especial, el mejoramiento de plantas mediante la ingeniería genética depende de que se tenga un protocolo establecido de regeneración de retoños, ya sea por organogénesis o por embriogénesis somática (Cao & Hammerschlag, 2000).

Debnath & McRae (*In Vitro*, 2001) observaron regeneración indirecta de retoños adventicios en callos que se formaron en la base de plantas siendo propagadas en medios con

2iP o zeatina. Por otro lado, también se ha usado TDZ (tidiazuron), el cual tiene efectos de citoquinina y auxina, para inducir un callo altamente regenerativo (Debnath, 2003). Sin embargo, es recomendable que los protocolos de regeneración de *Vaccinium* se dirijan por la regeneración directa, sin pasar primero por una fase de callo (Meiners, 2007; Qu et al. 2000) para evitar una inestabilidad genética que puede llevar a variación somaclonal (Pierik, 1987).

Para la regeneración directa en *Vaccinium*, hay reportes en los que se utilizan citoquininas como TDZ, zeatina, zeatina ribósido y 2iP, sin la adición de auxinas al medio (Cao & Hammerschlag, 2000; Debnath, 2006) y pocos en los que se añade auxina (Meiners, 2007). Con TDZ, se ha visto que medios con 0.2 mg/l en blueberry o 1 mg/l en lingonberry son eficientes para la regeneración directa en explantes de hojas (Cao & Hammerschlag, 2000; Debnath, 2006). Un rango de 4.4 hasta 6.6 mg/l de zeatina produjo regeneración en el lingonberry (Debnath, 2006) y 7.7 mg/l de zeatina ribósido en el blueberry (Cao & Hammerschlag, 2000). En cuanto al 2iP, se ha utilizado concentraciones de 1 a 5 mg/l con éxito (Debnath, 2006).

En este estudio se investigó la propagación *in vitro* del mortiño. Se llevó a cabo la germinación de semillas y luego se hizo ensayos de multiplicación, elongación, enraizamiento y aclimatación de las plantas de mortiño. En otros experimentos, se llevó a cabo la introducción *in vitro* de yemas axilares a partir de tallos de mortiño recogidos en zonas de páramo y se probó medios para la regeneración de retoños a partir de hojas y tallos.

2. Objetivo general

El objetivo de este estudio fue desarrollar protocolos de germinación de semillas *in vitro*, de introducción *in vitro* de yemas axilares y regeneración de retoños a partir de explantes de mortiño.

3. Objetivos específicos

- Desarrollar un protocolo para el establecimiento de cultivos de mortiño *in vitro*, partiendo de semillas o de yemas axilares
- Determinar los medios de cultivo óptimos para lograr una multiplicación rápida, elongamiento y enraizamiento del mortiño.
- Determinar un método de aclimatación de plantas de mortiño obtenidas *in vitro*.
- Identificar las condiciones óptimas para la regeneración de plantas vía organogénesis a partir de diversos explantes.

4. Área de estudio

Este estudio se llevó a cabo en la Universidad San Francisco de Quito, campus Cumbayá, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. Las semillas se tomaron de frutos de mortiño adquiridos en un mercado local y los tallos de mortiño se recolectaron en Pasochoa (0°26'S, 78°29'W; Pichincha) y Quinticusig (0°42'S, 78°53'W; Cotopaxi).

5. Justificación

El mortiño y el blueberry, que es comercializado a nivel mundial, son dos especies diferentes. Sin embargo, el mortiño tiene el potencial de ser cultivado y comercializado de una forma parecida al blueberry por tener usos similares a éste. Incluso, en el Ecuador se está promocionando al mortiño con el nombre *Andean blueberry* (Asturizaga et al, 2006). Posiblemente se pueda crear un nicho en el mercado para genotipos superiores de esta especie, pero primero es necesario optimizar la propagación de la planta.

El mortiño ha recibido poca atención y no se ha hecho intentos de mejorar el cultivo, de manera que sus frutos son muy variables en tamaño, calidad y en sabor, pudiendo ser muy agrio hasta muy dulce. Es una especie que aún no se domestica por lo que sería necesaria más investigación antes de poder comercializarla más ampliamente. También es necesaria una evaluación del potencial del mortiño junto con las posibles dificultades que enfrentará su comercialización (National Research Council, 1989).

El blueberry de Estados Unidos es cultivado únicamente en la primavera y no hay una oferta que satisfaga la demanda de este fruto a lo largo de todo el año (National Research Council, 1989). Este es el caso también del lingonberry, ya que este fruto tiene tantos usos que su producción no es suficiente para suplir la demanda (Debnath, 2003). Como consecuencia, esta especie, que hasta hace poco crecía únicamente de forma silvestre, en los últimos años se ha domesticado a través de programas de mejoramiento y de propagación vegetativa (Debnath & McRae *In Vitro*, 2001). Sería necesario mejorar la calidad del frutos del mortiño, posiblemente produciendo un mortiño con fruto más grande y más dulce, para que tenga acogida a nivel internacional, especialmente en las épocas de escasez del blueberry (National Research Council, 1989).

La técnica de propagación a través del cultivo *in vitro* ofrece algunas ventajas frente a la propagación vegetativa tradicional. En primer lugar, una aplicación que puede tener el cultivo *in vitro* es para mantener colecciones de germoplasma de respaldo de *Vaccinium* (Reed & Abdelnour-Esquivel, 1991). Por otro lado, la micropropagación permite producir plantas libres de patógenos y a lo largo de todo el año (Gonzalez et al., 2000; Ostrolucká et. al, 2004).

Si se desarrolla un genotipo de mortiño con características favorables para el consumidor y que tenga acogida en el mercado, la propagación *in vitro* podría ser un punto clave en la multiplicación rápida de estos genotipos deseables y en la generación de mayores ganancias para el productor. Las especies de *Vaccinium* son altamente heterocigotas y las características favorables de los progenitores generalmente no se conservan al propagar por semillas (Debnath *Propagation*, 2006). Si se tiene una variedad de mortiño de interés comercial, producir plantas genéticamente idénticas a la planta progenitora por medio de cultivo *in vitro* sería una ventaja. Adicionalmente, el mortiño es una especie leñosa con crecimiento lento, y se ha visto que la micropropagación es más rápida que la propagación por cortes de estacas, por lo que es útil para la introducción a gran escala de nuevos genotipos de interés (Debnath y McRae, 2005). Desarrollar un protocolo para la propagación *in vitro* del mortiño podría ser una estrategia importante para empezar a aprovechar el gran potencial que tiene esta especie.

6. Materiales

6.1. Material Vegetal

Las semillas de mortiño se obtuvieron de frutos comprados en mercados locales de Quito. Las semillas desinfectadas se sembraron en medio de cultivo sin hormonas para su germinación. Las plántulas obtenidas se subcultivaron en medios con reguladores de crecimiento para los ensayos de propagación y de regeneración (Ver sección 7.1 y 7.4).

Los tallos de mortiño se recolectaron de plantas del Pasochoa (0°26'S, 78°29'W) o Quinticusig (0°42'S, 78°53'W). Ambas localidades son zonas de páramo dentro de las provincias de Pichincha y Cotopaxi, respectivamente, donde el mortiño crece de forma silvestre. En el Pasochoa, la recolección de material se realizó a alrededor de 3800 m.s.n.m., donde empieza una zona de pastizales en la que crecen los arbustos de mortiño (Stern, 1995). En Quinticusig, la recolección se hizo a alrededor de 2870 m.s.n.m. (Municipio de Sigchos, sf.). Los tallos desinfectados se utilizaron en ensayos de establecimiento de cultivo *in vitro* a partir de yemas axilares (Ver sección 7.2). Las hojas desinfectadas se utilizaron en ensayos de regeneración (Ver sección 7.4).

6.2. Desinfección de semillas y tallos de mortiño

- Cámara de flujo laminar (LABCONCO Purifier Clean Bench)
- Alcohol etílico – 70 %
- Hipoclorito de sodio – 2.5%
- Tween 20
- Agua destilada estéril

6.3. Propagación *in vitro* del mortiño

- Frascos de vidrio de 477 cc
- Medio mWPM (Woody Plant Medium modificado; Tabla 1): 20g/l sacarosa, 5.8g/l agar y pH 5.2
- Medio WPM-BB, Woody Plant Medium modificado para blueberries (Rowland & Ogden 1992): 20g/l sacarosa, 5.8g/l agar y pH 5.2

- Medio MS (Murashige & Skoog, 1962): 20g/l sacarosa, 5.8g/l agar y pH 5.2
- Medio 1/2 MS (Murashige & Skoog, 1962): 20g/l sacarosa, 5.8g/l agar y pH 5.2
- Reguladores de crecimiento:
 - TZR - Trans zeatina ribósido (Sigma)
 - NAA - Ácido-naftalenacético (Sigma)
 - 2iP - 6-(gamma,gamma-dimetilalilamino)purina (Caisson Laboratories)
 - BAP - 6-bencilaminopurina (Sigma)
 - GA3 - Ácido giberélico (Sigma)
 - KIN - Kinetina (Sigma)
 - IBA - Ácido indol-3-butírico (Sigma)
- Microscopio óptico Leica

6.4. Aclimatación

- Agua destilada estéril
- Tierra Agrotterra
- Tierra tipo I de Multiflor
- Tierra proveniente de la zona de pastizales del Pasochoa
- Turba + Perlita: Sunshine All Purpose Planting Mix
- Vasijas de barro
- Frasco de vidrio
- Fundas de plástico

6.5. Ensayos de regeneración

- Estereomicroscopio (Ward's)
- Medio mWPM
- Carbón activado
- Ácido cítrico
- Reguladores de crecimiento:
 - TZR - Trans zeatina ribósido (Sigma)

- NAA - Ácido-naftalenacético (Sigma)
- 2iP - 6-(gamma,gamma-dimetilalilamino)purina (Caisson Laboratories)
- BAP - 6-bencilaminopurina (Sigma)
- KIN - Kinetina (Sigma)
- 2,4-D - Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (Sigma)
- TDZ - Tiazuron (Caisson Laboratories)

7. Metodología

Al menos que se indique diferente, las plantas se mantuvieron bajo luz blanca de focos fluorescentes y bajo un fotoperíodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad.

7.1. Germinación *in vitro* semillas de mortiño

El medio de cultivo usado en la mayoría de ensayos fue mWPM, un medio modificado de Woody Plant Medium (Lloyd & McCown 1980), formulado en base a medios usados en otros estudios para *Vaccinium* (Tabla 1). También se realizó ensayos usando medio MS (Murashige & Skoog, 1962), 1/2 MS (con la mitad de concentración de sales MS) o medio WPM modificado para *blueberries* (Rowland & Ogden, 1992), denominado WPM-BB en este estudio. La composición de estos cuatro medios se detalla en la Tabla 1.

Los medios se repartieron en frascos de vidrio de 477 cc y se autoclavaron por 15 minutos a 121°C, luego de lo cual se dejaron enfriar. Para la preparación de medios con hormonas termolábiles (trans-zeatina ribósido, 2iP, TDZ y ácido giberélico, GA₃), se esterilizó la hormona a través de filtros de 0.22 µm y ésta se añadió al medio autoclavado antes de que se solidifique, dentro de la cámara de flujo laminar. Las hormonas termoresistentes (BAP, NAA, IBA, kinetina y ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, 2,4-D) fueron añadidas al medio antes de autoclavar.

7.1.1. Obtención de semillas de mortiño

Los frutos de mortiño se cortaron por la mitad y se extrajeron las semillas con la ayuda de una cuchara pequeña. Se colocó a éstas en un tamiz y se las lavó con agua de la llave. Se dejó secar las semillas sobre papel absorbente y luego fueron guardadas en un frasco de vidrio pequeño hasta su utilización.

7.1.2. Desinfección de las semillas

Se hizo un ensayo preliminar de esterilización de semillas probando 5, 8, 10 ó 15 minutos en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5 %. En ensayos posteriores, el protocolo de desinfección utilizado consistió en sumergir las semillas en alcohol al 70% por tres minutos, lavarlas con agua destilada estéril y desinfectarlas por 10 minutos en hipoclorito de sodio al

2.5% y 4 gotas de Tween 20. Después de la desinfección, se lavó 5 veces con agua destilada estéril y se sembró en frascos con medio de cultivo basal sin hormonas.

7.1.3. Germinación de semillas de mortiño

Se quiso observar la influencia del tipo de medio en el porcentaje de germinación, para lo cual se probó los medios basales 1/2 MS y mWPM. También se quiso observar la diferencia entre el porcentaje de germinación de semillas mantenidas en oscuridad vs. semillas mantenidas en luz. Finalmente, se quiso determinar si un tratamiento en frío de las semillas (5°C por dos semanas) influye sobre este porcentaje. El diseño de estos ensayos se detalla en la Tabla 2.

7.1.4. Propagación de plantas de mortiño

Para las pruebas de propagación del mortiño, se usó el medio basal mWPM. En primera instancia, se intentó subcultivar las plántulas germinadas directamente a medio basal sin hormonas. Debido a que no se observó ramificación ni elongación de las plantas germinadas se prosiguió a hacer pruebas en medios con diferentes combinaciones y concentraciones de hormonas. Para promover elongación de las plantas germinadas, se probó concentraciones desde 1 hasta 10 mg/l de GA₃ y una combinación de NAA, 0.02 mg/l con GA₃ a 5 ó 20 mg/l.

Con el propósito de determinar si es posible mejorar el aspecto de las plántulas de mortiño, es decir, para que crezcan más robustas, para el resto de los ensayos se usó siempre una citoquinina (2iP, BAP, TZR) sola o en combinación con una auxina o giberelina.

Para los ensayos de propagación iniciales, se probó BAP (1 mg/l), BAP (1 mg/l) en combinación con GA₃ (5 y 10 mg/l), BAP (1 hasta 10 mg/l) en combinación con NAA (0.01 a 0.05 mg/l) y BAP (0.5 a 3 mg/l) en combinación con GA₃ (5 y 10 mg/l) y NAA (0.01 a 0.04 mg/l). Estos ensayos se hicieron a partir de semillas germinadas (Tabla 3).

También se hizo ensayos de brotación de yemas, usando tallos de plantas que habían elongado en medio basal. En este caso, se cortó los tallos en segmentos con tres nudos en cada uno para ver brotación de yemas en medio de cultivo con BAP (1 a 10 mg/l), NAA (0.01 y 0.05 mg/l) y 1% de carbón activado. La mitad de éstos fueron puestos aleatoriamente

en oscuridad por las primeras cuatro semanas. En un segundo ensayo de brotación de yemas, se probó concentraciones de 3 a 5 mg/l de BAP y 0.01 a 0.05 mg/l de NAA.

A fin de determinar el efecto de TZR sobre la propagación del mortiño, se probó TZR con plántulas germinadas (0.5 mg/l) o con segmentos de tallo (0.5 y 7 mg/l). También se combinó 1 y 2 mg/l de TZR con 10 mg/l de GA₃, usando plantas germinadas, y 1 mg/l de TZR con 0.05 mg/l de NAA usando segmentos de tallo y plantas ya propagadas anteriormente en TZR (Tabla 3). 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 que pueda ser usado en otros ensayos.

Finalmente, se quiso ver el efecto del 2iP para la propagación, a partir de plantas que habían sido propagadas en TZR y NAA. Se usó 2iP sólo (1 a 5 mg/l), o en combinación con NAA (0.05 y 0.1 mg/l). También se usó 2iP (1 a 5 mg/l) en combinación con TZR (1 mg/l) y en combinación con TZR (1 mg/l) y NAA (0.05 mg/l). Para referencia, se describen todas las combinaciones de hormonas y los rangos de concentraciones de éstas en la Tabla 3.

7.2. Introducción *in vitro* de yemas axilares de mortiño

7.2.1. Obtención de los tallos de mortiño

Se usó explantes de tallos de mortiño silvestre recogidos en 2 localidades, Pasochoa y Sigchos. Se escogió plantas de mortiño en las que fuera visible crecimiento reciente por su color verde claro y tejido suave. Se cortó alrededor de 8 cm del extremo del tallo, se remojó en agua y se colocó en botellas de plástico hasta el día siguiente.

7.2.2. Desinfección de los segmentos de tallos

Los tallos se lavaron bajo agua de la llave por tres a cinco minutos, y de éstos se removió todas las hojas, cortándoles con una tijera. Se cortó los tallos en segmentos de 5 cm de largo, se los sumergió por tres minutos en alcohol al 70% y luego se los lavó con agua destilada estéril. Se hizo una prueba de desinfección en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5% con 3 ó 4 gotas de Tween 20 y se probó 5, 10, 15 y 20 minutos de desinfección. También se probó 10, 15, 20 y 25 minutos en NaClO al 1.5 %. Se introdujo los tallos desinfectados en frascos con medio basal mWPM.

En experimentos posteriores, se usó únicamente tallos recogidos en Pasochoa. En estos experimentos se escogió tallos con yemas verdes visibles y se usó un tiempo de desinfección de 10 a 12 minutos en NaClO al 2.5%. Se realizó los cortes de tallo dentro de una solución estéril de ácido cítrico de 100 mg/l antes de introducirlos en el medio de cultivo. En ciertos experimentos se mantuvo los explantes en frascos con medio basal sin hormonas por 1 a 3 semanas (para observar contaminación) antes de traspasarlos al medio con hormonas. En otros experimentos se introdujo los explantes directamente a medios con hormonas. Se llevó a cabo varios experimentos probando diferentes tipos y combinaciones de hormonas, como se describe en la Tabla 4.

7.2.3. Iniciación de cultivo *in vitro* de mortño a partir de yemas axilares

Para pruebas con BAP y/o NAA, se mantuvo los explantes en medio basal por dos a tres semanas antes de traspasarlos a medios con hormonas. Se probó NAA solo a una concentración de 3 mg/l y BAP en un rango de 1 a 5 mg/l. También se hizo una prueba combinando 5 mg/l de BAP y 0.02 mg/l de NAA. En este experimento no se tomó en cuenta de qué parte del tallo se extrajo el explante.

En el resto de experimentos de introducción de yemas, sí se tomó en cuenta de dónde se extrajo el explante, es decir, si el explante provenía del ápice (SUP) del tallo o de la parte inferior más alejada del ápice (INF). Los explantes INF contenían 3 yemas en segmentos de 1 cm de largo, mientras los explantes SUP contenían múltiples yemas en segmentos del mismo tamaño. Para las pruebas iniciales de establecimiento de cultivo *in vitro* usando TZR, con o sin NAA, en el caso de combinaciones de hormonas que incluían NAA, la introducción se hizo en medio basal con la concentración correspondiente de NAA y se mantuvo en este medio por 1 a 3 semanas antes de pasar los tallos individuales a frascos de 4 ml que contenían medio con TZR + NAA. Se probó la introducción de yemas axilares en 0.5 mg/l de TZR. Al combinar con NAA, las concentraciones de TZR que se probaron variaron desde 1 hasta 7 mg/l y las de NAA, desde 0.05 hasta 0.1 mg/l, utilizando un explante proveniente del extremo del tallo (SUP), y cuatro o más explantes de la parte inferior (INF). Se hizo una prueba con 5 mg/l de TZR y 0.5 mg/l de NAA, pero solamente utilizando tallos INF. En

algunos casos en que se vio brotación de yemas en los medios con TZR + NAA, se hizo otro subcultivo a medio con 2iP sólo (3 mg/l) o 2iP (3 a 5 mg/l) con NAA (0.1 mg/l).

En base a los resultados obtenidos con los ensayos iniciales con TZR y NAA, se llevó a cabo otro ensayo utilizando un mayor número de tallos SUP. Se probó 1 y 7 mg/l de TZR en combinación con 0.1 mg/l de NAA. En este caso, se introdujo explantes individuales en frascos de 4 ml que contenían TZR + NAA con el objetivo de poder introducir los explantes directamente a medios con hormonas y evitar que la contaminación de algunos explantes se extienda a los demás. De esta introducción en TZR + NAA, los tallos con yemas verdes o con brotes que estaban creciendo se subcultivaron en los siguientes medios con 2iP sólo (3 y 5 mg/l) y 2iP (5 mg/l) en combinación con NAA (0.1 mg/l). Las plantas propagadas en 2iP, con o sin NAA, se subcultivaron a medio mWPM, 1/2 MS y MS para ver elongación y enraizamiento de las plantas.

En pruebas de introducción de yemas usando 2iP sólo (1 a 5 mg/l) o combinado con NAA (0.05 y 0.1 mg/l), se introdujo los segmentos de tallo directamente al medio basal con hormonas. Para cada combinación de hormonas se usó 3 segmentos de tallo SUP y 3 segmentos INF. En la Tabla 4 se describen todas las combinaciones de hormonas y rangos de concentraciones usados para el establecimiento de cultivo *in vitro* a partir de yemas axilares.

7.3. Elongamiento, enraizamiento y aclimatación

7.3.1. Elongación y enraizamiento de plantas de mortiño *in vitro*

Antes de aclimatar las plantas de mortiño propagadas *in vitro*, se hizo varias pruebas para enraizamiento y elongación de éstas. Se probó tanto combinaciones de hormonas como diferentes medios basales.

Partiendo de plantas que habían sido propagadas en TZR (0.5 mg/l), se hizo subcultivo de éstas en diferentes concentraciones de GA₃ (1 a 5 mg/l) o en BAP (3 mg/l) en combinación con NAA (0.02 mg/l), con el objetivo de observar elongación.

Partiendo de plantas propagadas en BAP con NAA y GA₃, se probó varias concentraciones de IBA (1 a 5 mg/l) para inducir enraizamiento. Con este mismo propósito, se hizo subcultivos en varias concentraciones de NAA (0.02 a 5 mg/l), a partir de plantas propagadas en TZR-0.5 mg/l.

Los medios basales probados para elongación y enraizamiento de las plantas fueron mWPM, 1/2 MS y WPM-BB. Se usó plantas que habían sido propagadas en TZR sólo (0.5 mg/l), TZR (1 mg/l) combinado con NAA (0.05 ó 0.07 mg/l) o en 2iP (1 ó 3 mg/l) más TZR (1 mg/l) con o sin NAA (0.05 mg/l),

Los medios usados para pruebas de elongación y enraizamiento se detallan en la Tabla 5.

7.3.2. Observación al microscopio de cortes de tallo y raíces

La mayoría de plantas que enraizaron desarrollaron raíces aéreas o cerca de la base de la planta, pero no se originaban directamente de la base. Por esta razón, se quiso observar si estas raíces que salían a lo largo del tallo tenían conexiones vasculares. Usando plantas que habían enraizado en medio mWPM sin hormonas, se hizo cortes de tallo a la altura del las raíces adventicias para observar el origen de éstas raíces en un microscopio óptico.

También se quiso ver la conductividad de las raíces, utilizando colorantes de comida. Se colocó las raíces de plantas de mortiño elongadas y enraizadas en mWPM en una solución de agua con colorante azul o en agua destilada sin colorante como un control negativo. Se realizó cortes de tallo cerca del extremo superior de los tallos de la planta y se observó bajo un microscopio óptico.

7.3.3. Aclimatación de plantas de mortiño introducidas *in vitro* por semillas

Para pasar a tierra las plantas que crecieron *in vitro*, se debió someter éstas a un proceso de aclimatación. Se realizó varios experimentos usando plantas que provenían de diferentes medios de cultivo o utilizando diferentes tipos de tierra, pero el procedimiento en general para la aclimatación fue similar en todos los experimentos.

Se preparó frascos de aclimatación en los que se puso vasijas de cerámica rellenas de tierra, agua para remojar la tierra y los frascos se taparon con papel aluminio y fueron autoclavados. De las plantas propagadas y elongadas *in vitro* se escogió las de mejor aspecto y que tenían un sistema de raíces bien desarrollado. Se las extrajo con cuidado y se removió todo el agar que estaba pegado a las raíces así como todas las hojas café y/o callo en la base

de las plantas. Se colocó las plantas dentro de la tierra a una profundidad suficiente para cubrir las raíces, que muchas veces eran aéreas.

Los frascos de aclimatación, que se taparon con plástico, no se mantuvieron directamente bajo luz fluorescente, para evitar que las plantas se secaran demasiado rápido. Se empezó a hacer huecos en el plástico, usando la punta de un esferográfico, después de 1 hasta 4 semanas. Se siguió haciendo más huecos durante las siguiente 4 a 6 semanas hasta que el plástico tuviera de 10 a 15 huecos. Alrededor de tres días después, el plástico se removió por completo. En este punto, las plantas que sobrevivieron estaban listas para ser pasadas a fundas con tierra.

En ensayos iniciales, se usó plantas germinadas provenientes de medio basal, que tenían un promedio de 36 mm y habían desarrollado abundantes raíces desde la base de la planta. La tierra que se usó fue Tierra tipo I de Multiflor. Se esperó una semana para hacer los primeros huecos en el plástico, y se quitó el plástico por completo cuatro semanas después.

En otros ensayos, se usó plantas que habían sido propagadas, elongadas y enraizadas en BAP más NAA. La tierra que se usó fue Tierra tipo I de Multiflor o Agrotterra. Se esperó alrededor de una a dos semanas para hacer los primeros huecos en el plástico, y se quitó el plástico por completo dos semanas después.

Se usó plantas provenientes de medios con NAA (5 mg/l). Se aclimataron plantas en Agrotterra, en una mezcla de Agrotterra con tierra que se trajo de Pasochoa, de la misma localidad de donde se hizo recolección de las plantas de mortiño, y otras plantas se aclimataron en tierra del Pasochoa. Se esperó cuatro semanas hasta hacer los primeros huecos en el plástico, y se quitó el plástico por completo cuatro semanas después.

Por otro lado, se usó plantas que habían sido elongadas y habían desarrollado abundantes raíces en medio basal mWPM o 1/2 MS o medios con 2iP (1 ó 3 mg/l) y NAA (0.05 ó 0.1 mg/l). Se usó tierra del Pasochoa o una mezcla de turba + perlita comercial (Sunshine All Purpose Planting Mix). Se esperó cuatro semanas hasta hacer los primeros huecos en el plástico, y cuatro a seis semanas hasta quitar todo el plástico.

7.4. Ensayos de regeneración y formación de callo a partir de explantes de hoja o tallo

Las pruebas de regeneración se llevaron a cabo tanto en hojas y tallos de mortiño traídos del Pasochoa, como en hojas provenientes de plantas *in vitro*. Se llevó a cabo varios ensayos en los que se varió el tipo de explante (hoja o tallo) y la combinación de hormonas (Tabla 6). Algunas veces los cortes se realizaron dentro de una solución de ácido cítrico de 50 a 150 mg/l y, adicionalmente, algunos de los medios contenían 1% de carbón activado para evitar que los explantes se oxiden.

En los experimentos de regeneración se usó el medio basal mWPM con la combinación de hormonas adecuada (o medio mWPM sin hormonas en el caso de la prueba de desinfección) en cajas petri de plástico. Las hojas que se introdujeron *in vitro* tenían un tamaño de 7 a 12 mm de largo y se colocó 5 a 6 de estas hojas en cada caja petri. Las hojas de plantas *in vitro* tenían un largo de hasta 5 mm, de manera que se colocó 5 a 10 de estas hojas en cada caja.

7.4.1. Desinfección de hojas y tallos de plantas de mortiño recogidas en el campo

Para introducir las hojas *in vitro*, se llevó a cabo un ensayo de desinfección. Se lavó todo el tallo de mortiño usando agua de la llave y luego las hojas se cortaron cerca del tallo con tijeras, teniendo cuidado de no dañar a la hoja. Se usó únicamente hojas jóvenes e intactas y sin rasguños. Trabajando dentro de la cámara de flujo laminar, las hojas se sumergieron por tres minutos en alcohol al 70% y se lavaron una vez con agua destilada estéril para remover el alcohol. Las hojas se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5 % + Tween 20, seguido por tres lavados en agua destilada estéril. En el ensayo de desinfección se probó 5, 10, 15 y 20 minutos, y en ensayos posteriores se usó entre 7 a 12 minutos de desinfección en NaClO.

Para estos ensayos con hojas introducidas, también se hizo un ensayo preliminar usando concentraciones de 50, 100, 150 y 200 mg/l de ácido cítrico, manteniendo las hojas cortadas en este medio por 1, 3 ó 24 horas antes de ponerlas en medio mWPM, para ver si el tratamiento evitaría la muerte de los explantes. Después de 2 y 4 semanas se observó si los bordes cortados de estas hojas seguían verdes y el estado del explante.

7.4.2. Pruebas de regeneración y formación de callo

Los primeros ensayos se realizaron para lograr regeneración directa o indirecta de retoños adventicios a partir de hojas y tallos introducidos u hojas de plantas *in vitro*. Posteriormente, se enfocó los ensayos en la inducción de callo y el mantenimiento de éste mediante subcultivos en combinaciones de hormonas adecuadas.

7.4.2.1. Hojas y tallos introducidos *in vitro*

Para las pruebas con hojas introducidas *in vitro* se hizo un ensayo con BAP (1 – 10 mg/l) y NAA (0.01 – 0.05 mg/l) en medios con 1% de carbón activado. También se probó concentraciones iguales de BAP y NAA y concentraciones iguales de KIN y NAA desde 1 hasta 7 mg/l, así como NAA sólo (1 a 7 mg/l), usando hojas y tallos introducidos, sin carbón activado. Con TZR solo, se usó únicamente explantes de hojas con concentraciones de 2 a 4 mg/l, sin carbón activado y concentraciones de 5 a 9 mg/l con 1% de carbón activado, y se probó TZR (2 a 4 mg /l) en combinación con NAA (0.02 mg/l) sobre hojas y tallos.

7.4.2.2. Hojas de plantas *in vitro*

Se hizo también pruebas con hojas de plantas *in vitro*. Con 1% de carbón activado, se usó 1 a 10 mg/l de BAP en combinación con 0.01 a 3 mg/l de NAA y, en medio sin carbón activado, se usó 1 a 10 mg/l de BAP combinado con 1 a 9 mg/l de NAA. Se probó 1 a 8 mg/l de KIN solo, o en combinación con 0.01 a 7 mg/l de NAA y 0.5 a 8 mg/l de KIN en combinación con 0.1 a 5 mg/l de 2,4-D. Usando 1% de carbón activado, se probó 7 mg/l de TZR ó 1 a 8 mg/l de TZR en combinación con 0.03 a 0.5 mg/l de NAA en medios sin carbón activado. Se probó TDZ solo (0.1 – 2 mg/l) o en combinación con NAA (0.2 y 0.5 mg/l), así como 2iP solo (1 – 9 mg/l), NAA solo (1 – 7 mg/l) y 2,4-D solo (0.05 – 10 mg/l).

7.4.2.3. Subcultivo de callos

En las pruebas de subcultivos de callos, se usó callos que habían sido obtenidos en los ensayos anteriores o a partir de callos generados en las bases de plantas de mortiño *in vitro*. Se probó concentraciones de 1 a 9 mg/l de BAP en combinación con 0.01 a 0.03 mg/l de NAA. También se usó KIN solo (1 – 8 mg/l), o en combinación con NAA (0.01 – 0.05 mg/l) y TZR (1 – 8 mg/l) en combinación con NAA (0.03 – 0.5 mg/l). Se usó también TDZ solo

(0.1 – 2 mg/l) o en combinación con NAA (0.2 y 0.5 mg/l), así como 2iP solo (1 – 9 mg/l) y NAA solo (3 mg/l).

Las combinaciones de hormonas utilizadas en las pruebas de regeneración se encuentran descritas en la Tabla 6.

8. Resultados

8.1. Germinación *in vitro* de semillas de mortiño

8.1.1. Desinfección de las semillas

En el experimento preliminar de desinfección de semillas se observó contaminación únicamente en el tratamiento con 5 minutos de esterilización en NaClO. Con 8, 10 y 15 minutos de desinfección no se observó contaminación ni diferencia en los tiempos de germinación, de manera que en experimentos posteriores se usó un protocolo de 10 minutos de esterilización en NaClO al 2.5%.

8.1.2. Germinación de semillas de mortiño

Se observó diferencias en los porcentajes de germinación entre los diferentes tratamientos. El porcentaje de germinación más alto, 60.7%, se dio en semillas en mWPM mantenidas en luz y con tratamiento de frío (Tabla 7). Los porcentajes de germinación más bajos se dieron en semillas germinadas en medio mWPM mantenidas en oscuridad y con tratamiento de frío y semillas germinadas en medio 1/2 MS mantenidas en luz y sin tratamiento de frío (40.2% y 42.8% respectivamente).

Sin importar el tratamiento, las semillas germinaron aproximadamente 20 días después de ser introducidas *in vitro* y se vio la aparición de las primeras hojas alrededor de 30 días después. En general no se observó elongación de las plantas germinadas hasta los 50 días. Pasados los 70 días, en pocas plantas se empezó a observar una elongación moderada de unos pocos milímetros, sin embargo, estas plantas tenían un aspecto delgado y débil. Se traspasó las plantas germinadas a medio fresco, pero se observó una altura máxima de 50 mm a los 250 días de haber sido introducidas las semillas en medio mWPM. En ninguna planta se observó ramificación (Figura 1).

8.1.3. Propagación de plantas de mortiño

Las plantas subcultivadas a mWPM sin hormonas no crecieron significativamente. Más de 40 días después del subcultivo, éstas tenían apenas 6 mm de altura, y tenían aspecto

delgado, por lo que en las siguientes pruebas se usó reguladores de crecimiento para intentar mejorar el aspecto de la planta.

Usando concentraciones de 3, 5 y 10 mg/l de GA₃ se observó una elongación más rápida de las plantas que con 1 mg/l de GA₃. Sin embargo, en las cuatro concentraciones, las plantas crecieron demasiado delgadas y débiles. En los subcultivos subsiguientes, las plántulas alcanzaron un máximo de 30mm de altura a los 270 días del subcultivo en GA₃ a partir de plantas germinadas. Las plantas permanecieron delgadas y las puntas de éstas se tornaron rojas o café, lo cual les impidió que sigan creciendo.

Las plantas subcultivadas en BAP (1 mg/l), tuvieron un crecimiento muy lento con las hojas superiores tornándose rojas progresivamente. La altura máxima que alcanzaron fue 15 mm después de 150 días de haber sido subcultivadas a medio con BAP. Pocas plantas se ramificaron y el número de ramificaciones en estas variaba desde 2 a 7 ramificaciones. Las plantas subcultivadas en BAP + NAA o en BAP + NAA + GA₃ tuvieron un crecimiento más rápido que las que se subcultivaron en BAP sólo. En este caso, también se observó que las hojas superiores se tornaron rojas o amarillentas, aunque las plantas siguieron creciendo a pesar de esto. Todas las plantas se elongaron pero eran delgadas y débiles, con muy poca ramificación. Algunas plantas tuvieron formación de un callo verde rojizo en la base y en otras se observó raíces aéreas después de un tiempo prolongado en BAP + NAA. El aspecto de las plantas en general no era bueno (Figura 2).

Se vio que los mejores medios para la brotación de yemas contenían 3 ó 5 mg/l de BAP y 0.01 mg/l de NAA (Tabla 8). El número de brotes que se obtuvo en estos medios fue mucho mayor, y éstos eran de un tamaño más grande. Adicionalmente, los brotes tenían un buen aspecto, es decir tenían hojas verdes y saludables (Figura 3). Sin embargo, en ninguno de los medios se vio elongación de los brotes. Estos permanecieron pequeños y eventualmente murieron. En el segundo ensayo, con 3, 4 ó 5 mg/l de BAP y 0.01, 0.03, ó 0.05 mg/l de NAA, se observó medios con un alto número de brotes verdes y de aspecto saludable, y con elongación de éstos (Tabla 9). En subcultivos posteriores de estas plantas, las hojas superiores se tornaron rojas y no continuaron desarrollándose.

Las plantas puestas en TZR en combinación con GA₃ desarrollaron pocas ramificaciones por planta y se vio una elongación de hasta 25 mm, 127 días después de haber

sido puestas en GA₃. En tres de cinco frascos con TZR (0.5 mg/l), las plantas desarrollaron pocas ramificaciones y las hojas superiores tenían color rojo. En dos de cinco frascos con sólo TZR, las plantas desarrollaron muchas ramificaciones y fue posible utilizarlas para experimentos posteriores con reguladores de crecimiento, o como material para seguir propagando en 0.5 mg/l de TZR. Se empezó a ver ramificación después de aproximadamente 50 días. Después de varios subcultivos, la rapidez de ramificación y de propagación aumentó y en algunos casos el aspecto de la planta mejoró (Figura 4). Sin embargo, también se vio que, desde el segundo subcultivo en TZR, algunas plantas, en vez de propagarse, desarrollaban hojas café y se morían.

Tanto en el tratamiento de TZR sólo y TZR en combinación con NAA usando segmentos de tallo, se empezó a ver brotación de yemas inmediatamente, tan solo 13 días después de haber sido colocados en el medio. En algunos segmentos de tallo en TZR (0.5 mg/l) se vio abundante ramificación mientras en otros sólo se vio moderada ramificación. En TZR (7 mg/l) se vio brotación en todos los tallos y estos brotes crecieron con aspecto saludable en algunos mientras que otros se tornaron café. En TZR (1 mg/l) + NAA (0.05 mg/l), en cambio, se vio abundante ramificación y un buen aspecto en la mayoría de plantas. En ninguno de los medios se vio elongación. En cinco de los seis subcultivos que se hizo en TZR-1 + NAA-0.05 a partir de plantas propagadas anteriormente en TZR-0.5 mg/l, las plantas empezaron a ramificarse abundantemente y tuvieron un aspecto 'bushy' (Figura 5). Estas plántulas no elongaron ni desarrollaron raíces. En subcultivos posteriores, éstas desarrollaron ramificaciones aún más compactas sin sobrepasar una altura de 25 mm.

En los ensayos con 2iP, se vio una tendencia de mayor elongación en las plantas que se mantuvieron en menores concentraciones de 2iP. En 1 mg/l de 2iP, las plántulas tenían buena elongación y un tamaño de hojas pequeño (2 mm) o mediano (3mm). El aspecto de las hojas varió entre verde o amarillento. Las plantas en 3 mg/l de 2iP tuvieron moderada elongación y el tamaño de las hojas era mediano o grande (4mm) y de color verde. Se vio claramente que las plantas en 5 mg/l de 2iP fueron las más pequeñas y compactas. En 2iP-5 mg/l se observó moderada ramificación de las plantas y éstas tenían hojas pequeñas de 2 mm y de color verde. En los medios que tenían NAA se vio mayor elongación y enraizamiento

(Figura 6). En todas las combinaciones de hormonas por lo general se vio un desarrollo de raíces aéreas, excepto en 5 mg/l de 2iP, donde sólo una planta desarrolló raíces (Tabla 10).

En todas las combinaciones de 2iP y TZR, con o sin NAA, se obtuvo plantas de aspecto ‘bushy’ y en todos los frascos se vio el desarrollo de raíces aéreas en la mayoría de plantas. Se observó poca elongación de las plantas, y el tamaño de las plantas variaba entre 18 y 25 mm, según el medio (Tabla 11).

8.2. Introducción *in vitro* de yemas axilares de mortiño

8.2.1. Desinfección de los segmentos de tallos

No se encontró un protocolo que permita erradicar totalmente la contaminación de los tallos que se introdujeron *in vitro*. Tanto con 2.5% de NaClO y 1.5% de NaClO en todos los tiempos que se probaron; se observó contaminación de uno o más tallos dentro de cada frasco. Al mismo tiempo, se vio que muchos tallos se tornaban cafés después de algunas semanas en el medio.

Para minimizar el daño a los explantes, se escogió una desinfección de 10 a 12 minutos en NaClO al 2.5%, y se hizo los cortes de segmentos de tallo en una solución de ácido cítrico antes de ponerlos en el medio de cultivo. Ya que esta desinfección no era totalmente eficiente, la estrategia que se siguió para algunos experimentos fue introducir los tallos en frascos con medio basal para observar si existía contaminación antes de pasarlos a medio con hormonas. Otra estrategia fue colocarlos individualmente en frascos de 4 ml, lo cual permitió poner los explantes en medio con hormonas inmediatamente después de su desinfección.

8.2.2. Iniciación de cultivo *in vitro* de mortiño a partir de yemas axilares

En NAA-3 mg/l, se vio crecimiento de las yemas pero las hojas nuevas crecían en mal estado. Hubo formación de callo a lo largo del explante hasta que las hojas nuevas morían y crecía callo en su lugar. En las diferentes concentraciones de BAP (1, 3 y 5 mg/l) o BAP (5 mg/l) + NAA (0.02 mg/l), se observó que a los 54 días del subcultivo en estas concentraciones, las yemas no habían crecido y todos los explantes se habían tornado cafés.

Usando TZR (0.5 mg/l), se observó que brotó una yema en uno de los tallos INF a los 22 días en el medio. Sin embargo, a los 64 días, ésta no había crecido más y se tornó café el tallo y la yema.

En las combinaciones con TZR y NAA, al usar 0.05 mg/l de NAA no se obtuvo buenos resultados. Solamente se vio crecimiento de yemas de tallos INF a los 15-17 días en 1 mg/l de TZR y 0.05 mg/l de NAA. El tamaño máximo que alcanzaron algunas fue de 5 mm a los 57 días, pero eventualmente todas las yemas y tallos se hicieron cafés.

Usando 0.1 mg/l de NAA en combinación con TZR, se vio brotación de las yemas únicamente en los tallos SUP, en concentraciones de 1, 5 y 7 mg/l de TZR. Ninguno de los tallos INF brotó y, eventualmente, las yemas y tallos se hicieron cafés. En el caso de tallos SUP que brotaron, se dio crecimiento de una sola yema o de varias yemas en un mismo tallo. El medio con 7 mg/l de TZR y 0.1 mg/l de NAA en tallos SUP dio los mejores resultados, ya que permitió que broten más de 25 yemas en un mismo tallo (Figura 7). El nuevo medio al que se traspasaron las yemas brotadas contenía 2iP, con o sin NAA.

De los brotes que se pasaron a 2iP, con o sin NAA, sobrevivieron la mayoría y se siguieron ramificando y creciendo hasta una altura de alrededor de 13 mm a los 104 días de subcultivo en este medio. En 3 mg/l de 2iP, las hojas tenían un color verde de aspecto saludable (Figura 8). En 2iP (3 mg/l) con NAA (0.1 mg/l) se ramificaron en menor cantidad y se elongaron más, pero las hojas tenían un color verde amarillento y se formó callo café en la base de algunas plántulas. En 2iP (5 mg/l) con NAA (0.1 mg/l) se vio mayor ramificación y menor elongación en este medio que en los anteriores pero las hojas superiores eran pequeñas y amarillentas en algunas plantas.

En el segundo ensayo con TZR y NAA, introduciendo los tallos desinfectados directamente al medio con hormonas, se vio nuevamente que los tallos SUP fueron los mejores explantes para la brotación de yemas. En TZR (1 mg/l) con NAA (0.1 mg /l), sólo 1 de 10 segmentos de tallo SUP presentó crecimiento en las yemas. Los brotes eran de color verde y tenían un tamaño de 2 a 6 mm. 4 de 10 segmentos de tallo INF presentaban yemas verdes de 1 mm. En TZR (7 mg/l) con NAA (0.1 mg /l), 3 de 6 segmentos de tallo SUP presentaban brotes verdes de 2 a 10 mm. En los tallos INF, 2 de 6 segmentos de tallo tenían

yemas verdes de 1 a 2 mm. Sin embargo al subcultivar en 2iP, solamente los brotes de tallos SUP siguieron creciendo mientras que las yemas de tallos INF murieron.

En el caso de tallos SUP, se tuvo una mayor propagación y ramificación con 2iP – 3 mg/l y 2iP – 5 mg/l, en los que las plantas alcanzaron una altura de 15 y 18 mm. En 2iP – 5 mg/l + NAA – 0.1 mg/l, las plantas tenían una altura de 15 mm pero no estaban muy ramificadas y tenían peor aspecto por el color de las hojas. Todas las yemas brotadas de tallos INF habían muerto a los 58 días de subcultivo en 2iP con o sin NAA. De las plantas subcultivadas a medios de cultivo 1/2 MS, MS y mWPM, se observó que el medio MS fue el menos óptimo, ya que las plantas de mortño se tornaron rojas y no crecieron. En los medios 1/2 MS y mWPM, en cambio, se dio elongación de las plantas pero se observó poco enraizamiento de las mismas.

Al introducir yemas directamente a 2iP con o sin NAA, se observó que a los 24 días en el medio con hormonas, los tallos SUP tenían yemas que aún no estaban creciendo, mientras que los tallos INF tenían yemas verdes que estaban empezando a brotar. También se vio un cambio de color del medio por fenoles que exudaban las plantas. A los 73 días en el medio, se observó que los explantes SUP e INF de la mayoría de combinaciones de hormonas se habían tornado café y habían muerto. La única excepción fue el frasco con 2iP – 5 mg/l, en el que 2 de los 3 tallos SUP tenían yemas verdes que estaban brotando. A los 103 días en 2iP – 5 mg/l, los brotes tenían un tamaño de 1 a 2 mm y seguían verdes.

8.3. Elongamiento, enraizamiento y aclimatación

8.3.1. Elongación y enraizamiento de plantas de mortño *in vitro*

En tres de los cuatro frascos en los que se hizo subcultivo a BAP + NAA, los explantes se hicieron cafés en menos de 60 días y eventualmente murieron. Solamente en un frasco se observó elongación de las plantas y crecimiento de raíces aéreas en 7 de 8 plantas. Tras varios subcultivos, muchas plantas alcanzaron un tamaño promedio de 40mm, aunque algunas plantas alcanzaron 60mm.

En cuatro de los cinco subcultivos en 3 mg/l de GA₃ las plantas empezaron a tornarse cafés a los 30 días en el medio. Sin embargo, en uno de los subcultivos en 3 mg/l de GA₃ y en ambos subcultivos en 1 mg/l de GA₃ y 5 mg/l de GA₃, las plantas sobrevivieron y se

elongaron. En GA₃, la mayor altura que alcanzaron las plantas fue, en promedio, 44 mm. Sin embargo, en todas éstas, las hojas superiores de las plantas eventualmente se secaron y se hicieron cafés.

Se empezó a ver raíz en algunos frascos a partir de los 40 días del subcultivo en IBA. A los 97 días del subcultivo en IBA, el porcentaje de enraizamiento variaba desde 30% hasta 60% (Tabla 12). Estas raíces eran aéreas y para una misma planta, se desarrollaron pocas raíces por planta. En algunas plantas, también se observó un enrojecimiento de las hojas superiores (Figura 9).

En concentraciones menores o igual a 1 mg/l de NAA, las plantas no desarrollaron raíces y, eventualmente, se tornaron cafés y murieron. En concentraciones mayores o igual a 2 mg/l de NAA, se empezó a ver enraizamiento a partir de los 21 días del subcultivo en la hormona, y la raíz se desarrolló desde el tallo de las plantas. A los 60 días, la mayoría de plantas habían desarrollado raíces blancas, gruesas y pequeñas, sin embargo, también se formó un callo blanco o café en la base de la planta.

Al subcultivar en mWPM a partir de plantas propagadas en TZR solo, TZR + NAA o TZR + 2iP con o sin NAA, las plantas crecieron considerablemente, alcanzando una altura de hasta 85 mm y muchas tenían raíces aéreas o de la base de la planta. Estas plantas tenían un aspecto robusto, con hojas de 3 mm de tamaño. Todas las plantas subcultivadas en medio 1/2 MS a partir de plantas propagadas en TZR + NAA o TZR + 2iP con o sin NAA tuvieron una elongación rápida; alcanzando una altura de hasta 80 mm. Todas éstas desarrollaron raíces aéreas y algunas también desarrollaron raíces gruesas y largas desde la base (Figura 10). En comparación con mWPM y 1/2 MS, el medio WPM-BB, permitió mayor elongación de las plantas que el medio 1/2 MS y menor elongación que en mWPM. En WPM-BB hubo escasa formación de raíces.

8.3.2. Observación al microscopio de cortes de tallo y raíces

Al observar los cortes de tallo con raíces aéreas en el microscopio óptico, se pudo ver que las raíces sí tenían una conexión vascular directa con los tejidos conductores del tallo (Figura 11). En las pruebas de tinción con colorante azul, no se vio una diferencia significativa entre plantas con raíces sumergidas en colorante y plantas con raíces sumergidas

en agua. Esto parecería indicar que la planta no absorbió el colorante y que, posiblemente, las raíces no sean funcionales a pesar de que tengan conexiones vasculares (Figura 12 y 13).

8.3.3. Aclimatación de plantas de mortiño introducidas *in vitro* por semillas

De las plantas aclimatadas a partir de plantas germinadas, la mayoría sobrevivieron 45 días hasta ser pasadas a fundas de plástico con tierra y en este tiempo crecieron entre 5 y 30 mm. Sin embargo, al pasarlas a funda, no se vio crecimiento de ninguna de las plantas, y todas murieron entre 6 y 30 días después.

De las plantas provenientes de medios con BAP y NAA, la mitad murió durante el proceso de aclimatación antes de pasarles a funda. Algunas plantas se secaron durante la aclimatación mientras otras se contaminaron y murieron. En este tiempo las que sobrevivieron crecieron entre 5 y 20 mm. Sin embargo, al pasarlas a funda, murieron enseguida o hasta 30 días después.

De las plantas sembradas en tierra del Pasochoa, a partir de plantas enraizadas en NAA, 2 plantas sobrevivieron hasta ser pasadas a funda y en ese tiempo crecieron 5 y 16 mm. Sobrevivieron alrededor de 23 días en funda antes de secarse completamente.

Usando tierra del Pasochoa o una mezcla de turba y perlita, se aclimató plantas que habían sido elongadas y enraizadas en 2iP + NAA, en mWPM sin hormonas ó 1/2 MS sin hormonas. Las plantas en estos medios tenían abundantes raíces aéreas y un aspecto robusto y elongado (Figura 14). Sin embargo, hubo una alta contaminación de las plantas durante el proceso de aclimatación, y sólo 4 de 12 plantas sobrevivieron hasta poder ser transplantadas a fundas de plástico con tierra. Una vez colocadas en las fundas de plástico, éstas murieron en el transcurso de las siguientes tres semanas.

8.4. Ensayos de regeneración y formación de callo a partir de explantes de hoja o tallo

8.4.1. Desinfección de hojas y tallos de plantas de mortiño *ex vitro*

En la prueba de desinfección de los explantes, no se vio contaminación en ninguno de los 7 explantes que se usaron para cada tiempo de desinfección (5, 10, 15 ó 20 minutos). Sin embargo, en los experimentos posteriores, se vio un alto porcentaje de contaminación con 5

minutos de desinfección pero también se observó que, incluso con un tiempo de 5 minutos, las hojas se hacían cafés pocos días después. En experimentos posteriores se usó un tiempo de desinfección de 10 minutos.

También se intentó evitar que los explantes se hagan cafés realizando los cortes de los explantes dentro de ácido cítrico. A las dos semanas, se observó que con 50 y con 150 mg/l de ácido cítrico había un mayor número de hojas que todavía tenían un borde verde que con las otras concentraciones de ácido cítrico. Sin embargo, a las 4 semanas, la mayoría de hojas que habían sido tratadas con 50 y 150 mg/l de ácido cítrico habían desarrollado un borde café. No se observó una correlación entre los bordes verdes/café y el uso de medios con carbón activado.

8.4.2. Pruebas de regeneración y formación de callo

8.4.2.1. Hojas y tallos introducidos in vitro

En las combinaciones de BAP y NAA que se probó en hojas introducidas, con concentraciones bajas de NAA (0.01 ó 0.05 mg/l), se observó que todas las hojas se habían tornado cafés entre 30 y 65 días después de ser introducidas *in vitro*. En medios con concentraciones iguales de BAP y NAA (1, 3, 5 ó 7 mg/l), se observó que las hojas desarrollaron un callo verde o verde oscuro de alrededor de 3 mm en los bordes de las hojas y que podían tener buen o mal aspecto.

Las hojas y tallos colocados en medios suplementados con KIN y NAA desarrollaron callo en casi todas las concentraciones. El mejor medio para hojas fue KIN, 5 mg/l, y NAA, 5 mg/l, donde se formó callo que estaba en buen estado y tenía 4 mm. En los tallos introducidos, KIN (5 ó 7 mg/l) con NAA (5 ó 7 mg/l) tuvieron callo verde o verde con blanco en buen estado de 4 a 5 mm a los 79 días. A los 153 días, todos los tallos en KIN (5 mg/l) y NAA (5 mg/l) formaron callos de 9 mm y luego se subcultivaron en medios con TDZ y NAA.

Las hojas y los tallos por lo general no reaccionaron al ser puestas en medio con sólo NAA. Los explantes que sí reaccionaron tuvieron un crecimiento de callo mínimo de 1 mm a los 78 días en el medio. En TZR con o sin NAA, no se observó reacción en las hojas

introducidas en ninguna de las combinaciones que se probó. La mayoría de hojas se habían hecho cafés entre 44 y 65 días después de haber sido introducidas *in vitro*.

8.4.2.2. Hojas de plantas *in vitro*

En las pruebas de BAP y NAA con carbón activado, en las que se usó concentraciones de NAA de 0.01 y 0.05 mg/l, se observó que a los 45 días todos los explantes de hoja se habían hecho cafés. En las pruebas con concentraciones de NAA más altas, de 0.1 a 9 mg/l, en cambio, se observó que en la mayoría de cajas estaba creciendo callo. El color de este callo variaba entre amarillo, verde, rojo o blanco. De manera general, una concentración alta de NAA (1 a 9 mg/l) induce la formación de callos grandes (>8 mm) en más de la mitad de los explantes.

En todas las concentraciones de kinetina sin NAA o con concentraciones bajas de NAA (0.01 a 0.1 mg/l), las hojas no produjeron callo o se formó callo en pocas hojas. Los medios que contenían KIN y 0.5 mg/l de NAA dieron un mayor número de callos que los medios anteriores, pero sólo KIN – 2 mg/l + NAA – 0.5 mg/l permitió la formación de callos de color verde oscuro y de 9 mm a los 84 días en el medio. En los medios con KIN y NAA en concentraciones iguales (1 ó 3 mg/l) también se formó callo verde oscuro pero de menor tamaño (~ 5 mm). En general, con KIN y 2,4-D, a los 25 días se vio formación de callo en todos los medios que se probó. Sin embargo, pasado este tiempo, muchos callos en las concentraciones altas de 2,4-D (mayor a 1 mg/l), empezaron a tornarse café. En combinaciones de kinetina a 2,4 y 6 mg/l con 2,4-D a 0.1 y 0.5 mg/l se vio un mayor porcentaje de formación de callo y éstos eran de color blanco y tenían buen aspecto.

No se observó ninguna reacción en las hojas al ser colocadas en medio con TZR con o sin NAA. Se vio que estas hojas se hacían cafés entre 21 y 35 días después de haber sido colocadas en el medio.

Las hojas colocadas en medio con 2iP, no tuvieron formación de callo, 87 días después de haber sido colocados en el medio.

Las hojas colocadas en medio con TDZ sólo o con 0.2 mg/l de NAA por lo general se tornaron cafés sin formar callo o se formó callo en pocas hojas. En todos los medios con 0.5 mg/l de NAA se vio formación de callo en la mayoría de explantes. Sin embargo, sólo se

observó formación de callo verde en medios que contenían 1.5 ó 2 mg/l de TDZ en combinación con 0.5 mg/l de NAA. Este callo tenía entre 1 y 2 mm de tamaño a los 87 días en el medio.

Sólo las hojas que se colocaron en medio con 1 y 3 mg/l de NAA empezaron a formar un callo pequeño de color café o amarillo, respectivamente. En medios con 2,4-D solo, se vio formación de callo pequeño de color blanco o amarillo en menos de la mitad de los explantes. El medio con mayor porcentaje de formación de callos (5 de 10 explantes) fue con 0.5 mg/l de 2,4-D y los callos de mayor tamaño se dieron en 2,4-D – 2.5 mg/l.

8.4.2.3. Subcultivo de callos

En los subcultivos de callos en BAP y NAA, se vio que éstos progresivamente se tornaron rojos o cafés y finalmente murieron. Solamente en BAP 1 mg/l + NAA – 0.02 mg/l se vio crecimiento de nuevo callo blanco en los bordes de los callos. Todos los callos en KIN + NAA crecieron hasta un tamaño de 14 mm, pero empezaron a tornarse cafés después de los 68 días en el medio. En los callos que se subcultivaron a TZR con NAA se vio que, aunque crecieran levemente (5 mm), se fueron tornando cafés progresivamente.

En medios con TDZ y NAA, hubo varias combinaciones de hormonas en las que se produjo callos de tamaño grande (más de 15 mm) y de un color verde saludable. Los medios en los que se formó callos de tamaño más grande fueron 0.1 y 1 mg/l de TDZ en combinación con 0.2 mg/l de NAA, los cuales tenían 18 mm de diámetro a los 87 días en el medio. A estos callos fue posible subcultivar y seguir propagando en el mismo medio (Figura 15).

En todas las concentraciones de 2iP, los callos crecieron hasta un tamaño de 8 a 15 mm. El medio en que mejor aspecto tenían fue 2iP – 5 mg/l, donde crecieron hasta un tamaño de 14 mm y tenían un color verde saludable. Al hacer subcultivos de callos verdes en medio con 3 mg/l de NAA, la mitad de éstos crecieron poco y en mal estado, mientras que otros crecieron verdes y en buen estado.

9. Discusión

9.1. Germinación *in vitro* de semillas de mortiño

Se vio que el mejor tratamiento para germinación de semillas, fue mWPM sin tratamiento de oscuridad y con un tratamiento en frío de las semillas, a 4°C por dos semanas. Por otro lado, las semillas tratadas en frío, sembradas en mWPM y con tratamiento de oscuridad tuvieron el porcentaje de germinación más bajo. También se observó que en el medio 1/2 MS, el cual tiene un contenido de iones diferente al mWPM (Tabla 13), tuvo un porcentaje de germinación más bajo en relación al mWPM.

El tratamiento que recibieron las semillas no influyó sobre el tiempo que demoraron en germinar, el cual fue alrededor de 20 días. El procedimiento establecido para la desinfección de semillas fue eficaz y se obtuvo un máximo de 60.7% de germinación. El tiempo de germinación de este estudio es más largo en comparación con otro estudio en lingonberry, donde las semillas se remojaron en agua destilada antes de ser sembradas en el medio y demoraron 4 a 6 días en germinar (Debnath, 2003). En comparación, en un estudio de Jaakola et al. (2001) con lingonberry y milberry, en el que usan un protocolo de desinfección similar al que se usó con el mortiño, se obtuvo un 90% de germinación de semillas después de 2 semanas.

El medio de cultivo que se utilizó en la mayoría de experimentos fue el mWPM (Woody Plant Medium modificado). Este medio se formuló en base al medio Woody Plant Medium modificado para propagación de *blueberries* (denominado WPM-BB en este estudio) de Rowland & Ogden (1992), ya que se utiliza comúnmente para la propagación del *blueberry* (Debnath & McRae *In Vitro*, 2001). Se calculó las cantidades de macronutrientes del mWPM que dieran el contenido de iones más parecido al de WPM-BB. La concentración de iones de los cuatro medios usados en este estudio se describe en la Tabla 13.

El contenido de iones del medio MS es el más alto de los cuatro. MS, en comparación al medio WPM-BB y mWPM, tiene igual concentración de algunos iones mientras que para otros tiene una concentración hasta seis veces mayor. El medio formulado para este estudio tiene similares concentraciones de iones del WPM-BB, con la excepción de los iones cloruro

y potasio. Además, aunque la concentración de nitrógeno total es parecida, el balance entre nitrato y amonio es diferente para ambos medios. Por otro lado, se trató de emular únicamente la composición de macronutrientes de WPM-BB, sin tomar en cuenta la composición de micronutrientes y otros aditivos como la glicina. A pesar de las diferencias, el medio mWPM fue adecuado para la germinación y propagación subsiguiente de las plantas de mortiño.

En esta investigación se utilizó un pH bajo (5.2) y una concentración de sucrosa de 20 g/l ya que son parámetros que se utilizan comúnmente en varias especies de *Vaccinium* (Gonzalez et al., 2000; Tetsumura, 2008; Cao et al., 2003). No se realizó un estudio profundo en el que se determine el efecto del pH o la cantidad de azúcar del medio sobre la propagación y crecimiento del mortiño, de manera que aún no se ha determinado si estos parámetros que fueron utilizados son los adecuados para el mortiño.

Para lograr la propagación del mortiño se probó diferentes concentraciones y combinaciones de hormonas ya que se vio que no sería posible propagar las plantas germinadas en medio basal sin hormonas. Se observó que muchas plantas que se mantuvieron en este medio no crecieron y finalmente murieron. Se encontró que la mejor opción para incrementar el número de plantas y establecer el cultivo *in vitro* a partir de semillas fue usar 1 mg/l de trans-zeatina ribósido (TZR) o en combinación con 0.05 mg/l de NAA.

En ensayos iniciales, se probó combinaciones de BAP, NAA, GA₃ o TZR con GA₃ a partir de semillas germinadas. Con estas combinaciones de hormonas, aunque sí se hubo plantas de mortiño que se elongaron o que se ramificaron, éstas no tenían un aspecto saludable. En algunos casos, las plantas desarrollaron hojas superiores de color rojo y no continuó el crecimiento. En otros casos se obtuvo elongación, pero poca ramificación y crecimiento de plantas demasiado delgadas. En un estudio con *Vaccinium* no se logró establecer cultivos a partir de semillas utilizando BAP y NAA (Jaakola et al., 2001). Gonzalez et al. (2000) observaron que el GA₃ tiene un efecto negativo para la multiplicación de *Vaccinium*. Con el mortiño, sí ocurrió una multiplicación moderada o brotación de yemas con estas hormonas pero no un buen crecimiento de las plantas.

En este estudio se probó TZR para la propagación de plantas germinadas, en vez de 2iP como lo hizo Pereira (2006) con *V. cylandraceum* y Jaakola et al. (2001) con el lingonberry y milberry. Sin embargo, tanto 2iP como TZR son citoquininas que probablemente tienen un efecto de reducir la dominancia apical fuerte que es característica de varias especies de *Vaccinium*, permitiendo así el desarrollo de las yemas axilares (Debnath y McRae *In Vitro*, 2001; Debnath y McRae *An Efficient*, 2001).

Entre los protocolos para propagar especies de *Vaccinium* generalmente se utiliza sólo zeatina (Debnath *Influence of*, 2006; Tetsumura et al., 2008), sólo 2iP (Debnath & McRae *In Vitro*, 2001; Noé & Eccher, 1994; Noé et al., 1998) o una combinación de los dos (Cao et al., 1998; Cao & Hammerschlag, 2000). Hay pocos autores que empleen también una auxina como parte del protocolo de la propagación de *Vaccinium* (Meiners, 2007). Los protocolos de otros estudios con *Vaccinium* no son totalmente aplicables al mortiño y fue necesario optimizar el medio y hormonas usados para su propagación. Con el mortiño, se vio una propagación óptima y rápida al usar medios que contenían TZR y NAA. En estos medios se obtuvo menor elongación que en medios con 2iP. Gonzalez (2000), observó resultados similares: abundante propagación en *Vaccinium* pero inhibición de elongación al utilizar zeatina.

La rapidez de multiplicación de plantas de mortiño en 2iP aumentaba a medida que se aumentó la concentración de la hormona hasta 5 mg/l, pero se obtuvo una menor elongación en esta concentración. Aunque eran menos ramificadas que plantas en TZR + NAA, las plantas en 3 mg/l de 2iP, se elongaron más y tenían mejor aspecto en general ya que crecieron robustas y con hojas verdes de mayor tamaño. Esto concuerda con resultados en lingonberry y cranberry en los que se vio mayor tamaño y vigor de las plantas mantenidas en medios con 2iP (Debnath & McRae *In vitro*, 2001; Debnath & McRae, 2005).

9.2. Introducción *in vitro* de yemas axilares de mortiño

Con el protocolo de desinfección que se usó en este estudio, se observó un porcentaje de contaminación alto. Una estrategia para manejar este problema fue colocar los segmentos de tallo en frascos de 4 ml separados para aislar a los contaminados. Tetsumura et al. (2008) también observaron un porcentaje de contaminación alto de hasta 40%, utilizando explantes

de plantas mantenidas en un espacio abierto. Otros autores observaron un porcentaje de contaminación de hasta 10%, pero utilizaron plantas mantenidas en el invernadero (Debnath & McRae *In Vitro*, 2001). Los explantes de mortño se obtuvieron de plantas silvestres creciendo en su hábitat natural, lo cual podría explicar el alto porcentaje de contaminación que se observó.

En esta investigación se estudió la influencia de la parte del tallo de donde se extrajo el explante y de reguladores de crecimiento sobre el porcentaje de establecimiento de cultivos *in vitro* a partir de yemas axilares de mortño. Se vio que solo fue exitosa la introducción de yemas axilares al usar los segmentos extraídos de la parte superior del tallo, los cuales contienen múltiples yemas en un explante de 1 cm. En los explantes que no correspondían al extremo superior de la estaca, no se observó crecimiento, o se dio un crecimiento estancado, que no superó los 5mm de largo, sin importar el tratamiento usado. Los tallos en los que no se observó crecimiento se tornaron café progresivamente, presumiblemente por la oxidación de compuestos fenólicos que liberan los tejidos heridos (Debnath, 2008).

En este estudio se vio que de 36 explantes introducidos con 2iP con o sin NAA, sólo en 2 explantes en 2iP (5 mg/l) se observó crecimiento de las yemas. Los demás explantes murieron antes de los 70 días después de haber sido introducidos *in vitro*. En cambio, usando TZR (1mg/l y 7mg/l) en combinación con NAA (0.1 mg/l) se observó abundante brotación de yemas que, al ser subcultivadas a medios con 2iP (3 ó 5 mg/l), comenzaron a multiplicarse rápidamente. 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 multiplicación (Debnath & McRae *In Vitro*, 2001; Gonzalez et al., 2000; Reed & Abdelnour-Esquivel, 1991).

Algunos autores recomiendan utilizar 2iP en el establecimiento y en la propagación de especies de *Vaccinium*, mientras otros recomiendan usar zeatina en las primeras fases de iniciación o multiplicación y luego pasar a medios con 2iP antes de enraizar. La razón por esto es que la zeatina es una hormona muy cara como para usarla regularmente y el 2iP puede mejorar el aspecto de las plantas que se han propagado en zeatina (Jaakola et al., 2001, Debnath & McRae *In Vitro*, 2001). Con el mortño fue necesaria la utilización de trans zeatina ribósido para la fase de iniciación, debido a que el porcentaje de iniciación utilizando

sólo 2iP fue muy bajo. Como un segundo paso en el establecimiento del cultivo, fue necesario pasar las yemas que brotaron en TZR + NAA a medios con 2iP para permitir una elongación de las plantas.

9.3. Elongamiento, enraizamiento y aclimatación

En la literatura, para varios cultivos de *Vaccinium*, se lleva a cabo un proceso de aclimatación que dura entre 2 semanas a 2 meses (Debnath & McRae *In Vitro*, 2001; Noé & Eccher, 1994). En los experimentos llevados a cabo con el mortiño, se demoró un mes y medio hasta casi tres meses en aclimatar las plantas. Durante este tiempo, muchas plantas murieron porque se secaron y otras por contaminación de la tierra al hacer huecos en el plástico. Esta contaminación afectó a varias plantas que tenían buen aspecto durante el proceso de aclimatación. Las que sobrevivieron el proceso de aclimatación, al pasarlas a fundas plásticas con tierra murieron enseguida o sobrevivieron hasta 30 días después.

Se logró una propagación eficaz del mortiño en el medio mWPM al utilizar las hormonas adecuadas. Es posible que las condiciones del cultivo *in vitro* no sean las adecuadas aún ya que las plantas obtenidas no se pudieron aclimatar. Las plántulas obtenidas *in vitro* eran muy delgadas y con hojas pequeñas, con una morfología diferente a las plantas de mortiño que crecen en la naturaleza. Al observar cortes de tallos con raíces adventicias bajo un microscopio óptico, se pudo ver que las raíces sí tienen conexiones vasculares. Sin embargo, no se distinguió alguna diferencia entre cortes de tallo de plantas cuyas raíces habían sido sumergidas en colorante azul y el control negativo, posiblemente sugiriendo que las raíces no son funcionales.

Se ha reportado que las plantas cultivadas *in vitro* tienen una mala conductividad hídrica en las raíces, y que no hay conexiones adecuadas entre la raíz y el tallo. El mal transporte de agua, junto a una mala retención de agua de las hojas, puede llevar a que éstas se sequen rápidamente (Pospíšilová, 1999). En varios reportes, se logra el enraizamiento y aclimatación de plantas en un mismo sustrato (Gonzalez et al., 2000), pero en esta investigación con el mortiño, se realizó el enraizamiento *in-vitro* y aclimatación en fases separadas. Sin embargo, es posible que el método usado para enraizar las plantas de mortiño no sea adecuado, ya que no se ha obtenido ningún resultado positivo en la aclimatación hasta el momento.

9.4. Ensayos de regeneración y formación de callo a partir de explantes de hoja o tallo

Hay reportes de regeneración directa en explantes de hoja en medios con zeatina, zeatina ribósido, 2iP o TDZ (Debnath, 2006) y, con la finalidad de observar regeneración adventicia, se tomó en cuenta las diferentes concentraciones de hormonas que permitieron regeneración en otras especies de *Vaccinium*. Así, en el mortiño se probó concentraciones de 1 a 9 mg/l de TZR, 1 a 9 mg/l de 2iP y 0.1 a 2 mg/l de TDZ en explantes de hojas y/o tallos, en base a los rangos de hormonas usados por otros autores (Cao & Hammerschlag, 2000; Debnath, 2006). También se probó varias combinaciones de NAA con TZR o TDZ y otras hormonas no reportadas en la literatura como la kinetina o el 2,4-D. Sin embargo, no se obtuvo los resultados esperados en estos ensayos, y las hojas se tornaban cafés o formaban callo, pero no regeneraron retoños adventicios.

Los ensayos de regeneración con hojas o tallos introducidos *in vitro* no dieron resultados buenos ya que éstos se murieron enseguida, o después de varias semanas. Esto presumiblemente se debe a que el paso de desinfección era demasiado fuerte para el explante, a pesar de que no se logró eliminar por completo la contaminación. Se usó ácido cítrico y medios con carbón activado para tratar de evitar que los explantes se hagan cafés, y se vio formación de callo en los bordes de los explantes, pero no se observó regeneración de retoños.

No hay estudios que investiguen específicamente la inducción de callo o subcultivo de éste en especies de *Vaccinium*. Se reporta que, al usar concentraciones altas de citoquininas para la propagación, 5 mg/l de 2iP ó 2.5 mg/l de zeatina en el caso del lingonberry (Debnath & McRae, *In Vitro* 2001), ó 0.88 mg/l de zeatina en el caso del blueberry (Debnath, 2004), se puede formar callos con brotes adventicios en la base de los retoños. En los ensayos de propagación del mortiño, se observó formación de callo pero no regeneración de retoños en las bases de las plantas en medios que contenían NAA. Se reporta también que la presencia de TDZ o de auxinas causa formación de callo en explantes de hoja (Denath, 2006; Meiners 2007). En explantes de mortiño, en cambio, los medios que dieron altos porcentajes de inducción de callo fueron: BAP + NAA, KIN + 2,4-D, KIN + NAA y TDZ + NAA.

10. Conclusiones

En este trabajo se propone varias estrategias que pueden ser utilizadas para el establecimiento de cultivos *in vitro* del mortiño. Por un lado, se demostró que es posible introducir semillas *in vitro* y, a través de subcultivos en medios con reguladores de crecimiento, lograr que las plantas se multipliquen rápidamente. También se describe un método para la introducción *in vitro* de yemas axilares, donde es necesario una alta concentración de citoquininas para iniciar el crecimiento.

Se determinó que un tratamiento adecuado para la germinación de semillas fue mantenerlas en frío por dos semanas, sembrarlas en el medio mWPM y mantenerlas bajo luz. Un medio que contenía 1 mg/l de TZR y 0.05 mg/l de NAA fue el adecuado para brotación de yemas y para mantener una propagación continua del mortiño en subcultivos posteriores. Para el elongamiento y enraizamiento de plantas propagadas en TZR + NAA, se las subcultivó a medios con 3 mg/l de 2iP o a un medio basal mWPM o 1/2 MS sin hormonas. Hasta el momento, no se ha logrado estandarizar un protocolo eficiente para la aclimatación de las plantas de mortiño. En las pruebas de aclimatación, muchas plantas se hicieron café y murieron enseguida, otras murieron por contaminación de la tierra, y otras sobrevivieron el proceso de aclimatación pero se secaron después de ser pasadas a fundas.

Se logró establecer un protocolo para la introducción *in vitro* de yemas axilares de mortiño. Fue necesario usar únicamente explantes provenientes del extremo superior de los tallos en crecimiento en los que se veía claramente que hay crecimiento apical. Las yemas axilares brotaron al colocar el explante en medio con 7 mg/l de TZR y 0.1 mg/l de NAA y se subcultivaron a medios con 3 ó 5 mg/l de 2iP, los cuales permitieron un desarrollo y multiplicación posterior de las yemas.

No se pudo determinar un método que permita la regeneración de retoños adventicios. En algunas combinaciones de hormonas utilizadas, se dio formación de callo pero no se observó regeneración de brotes adventicios. El color del callo variaba entre blanco, amarillo, rojo y verde. Un medio con 2 mg/l de KIN + 0.5 mg/l de NAA o con 1.5 ó 2 mg/l de TDZ + 0.5 mg/l de NAA permitió la inducción de callo. Para el subcultivo de callos, un medio con 5 mg/l de 2iP o con 0.1 ó 1 mg/l de TDZ + 0.2 mg/l de NAA permitió el crecimiento de callos verdes con buen aspecto.

11. Recomendaciones

Los resultados obtenidos en esta investigación pueden servir como una base para el establecimiento de un protocolo de propagación del mortiño por cultivo *in vitro*. Sin embargo, a pesar de que se logró establecer el cultivo *in vitro*, es necesario mejorar algunos aspectos de la técnica, en especial en lo que se refiere al aspecto general de las plantas. De lo posible, sería óptimo encontrar las condiciones que permitan el crecimiento de una planta más robusta y menos delgada, con hojas más grandes y un sistema de raíces más gruesas que salgan desde la base de la planta, con el objetivo de lograr su aclimatación.

Algunas estrategias que se podría probar para lograr este objetivo sería variar la concentración de sucrosa o el pH del medio, así como continuar investigando diferentes medios basales que podrían mejorar el aspecto general de la planta. Esto es necesario ya que las plantas de mortiño, que crecen bien *in vitro*, no se adaptan nuevamente a condiciones *ex vitro* en la fase de aclimatación. Se recomendaría también buscar diferentes métodos de enraizamiento de las plantas, ya que es posible que éstas no tengan una conexión raíz-tallo adecuada, lo cual impediría la toma de agua y nutrientes del suelo.

En la introducción *in vitro* de yemas axilares, se podría probar varias concentraciones alrededor de 7 mg/l de zeatina, con el fin de mejorar el porcentaje de brotación de yemas axilares.

Ya que las pruebas de regeneración no dieron buenos resultados, sería posible investigar si plantas de diferentes localidades del país tendrían diferentes resultados. Otra estrategia sería desarrollar un método de propagación *in vitro* en el que las plantas tengan hojas más grandes y más adecuadas para pruebas de regeneración y luego probar otros medios o pretratamientos descritos en la literatura en la regeneración de especies de *Vaccinium* (Cao & Hammerschlag, 2002).

12. Bibliografía

- Ahuja, M.R. Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1992.
- Asturizaga, Adriana Sanjinés, Benjamin Øllgaard y Henrik Balslev. “Frutos comestibles.” Botánica Económica de los Andes Centrales. Ed. M. Moraes, B. Øllgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius y H. Balslev. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés, 2006. 329-346.
- Cao, X, FA Hammerschlag. “A Two-Step Pretreatment Significantly Enhances Shoot Organogenesis from Leaf Explants of Highbush Blueberry cv. Bluecrop.” HortScience. 37.5 (2002): 819-821.
- - - . “Improved Shoot Organogenesis from Leaf Explants of Highbus Blueberry.” HortScience. 35.4 (2000): 945-947.
- Cao, X, Q. Liu, LJ Rowland y FA Hammerschlag. “GUS expression in blueberry (*Vaccinium* spp.): factors influencing *Agrobacterium*-mediated gene transfer efficiency.” Plant Cell Reports 18 (1998): 266-270.
- Debnath, Samir C. “Influence of indole-3-butyric acid and propagation method on growth and development of in vitro- and ex vitro-derived lowbush blueberry plants.” Plant Growth Regul. 51 (2007): 245-253.
- - - . “Influence of propagation method and indole-3-butyric acid on growth and development of in vitro- and ex vitro-derived lingonberry plants.” Can J. Plant Sci. 86 (2006): 235-243.
- - - . “Improved Shoot Organogenesis from Hypocotyl Segments of Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.)” In Vitro Cell. Dev. Biol. 39 (2003): 490-495.
- - - . “*In Vitro* Culture of Lowbush Blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.)” Small Fruits Review 3.3/4 (2004): 393-4087.
- - - . “Propagation of *Vaccinium in Vitro: A Review*.” International Journal of Fruit Science 6.2 (2006): 47-71.
- - - . “Zeatin-induced one-step in vitro cloning affects the vegetative growth of cranberry (*Vaccinium macrocarpo* Ait.) micropropagules over stem cuttings.” Plant Cell Tiss Organ Cult. 93 (2008): 231-240.
- Debnath, Samir C y Kenneth B. McRae. “A One-Step *In Vitro* Cloning Procedure for Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.): The Influence of Cytokinins on Shoot Proliferation and Rooting.” Small Fruits Review 4.3 (2005): 57-74.
- - - . “*In Vitro* Culture of Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.): The Influence of Cytokinins and Media Types on Propagation.” Small Fruits Review 1.3 (2001): 3-19.
- - - . “An Efficient *In Vitro* Shoot Propagation of Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) by Axillary Bud Proliferation.” In Vitro Cell. Dev. Biol. 37 (2001): 243-249.

- Gonzalez, MV, M Lopez, AE Valdez y RJ Ordas. "Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from fieldgrown plants". Ann. appl Biol. 137 (2000): 073-078.
- Jaakola, Laura et. al. "Effect of N6-isopentenyladenine concentration on growth initiation *in vitro* and rooting of bilberry and lingonberry microshoots." Plant Cell Tissue and Organ Culture. 66 (2001): 73-77.
- Lloyd G, B McCown. "Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture." Comb. Proc. Intl Plant Prop. Soc. 30 (1980): 421-427.
- Luteyn, James L. "Diversity, Adaptation, and Endemism in Neotropical Ericaceae: Biogeographical Patterns in the Vaccinieae." The Botanical Review 68.1 (2002): 55-87.
- Meiners J, M Schwab, I Szankowski. "Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium species*." Plant Cell Tiss Organ Cult. 89 (2007): 169-176.
- Municipio de Sigchos. Gobierno Municipal de Sigchos. 12 Enero 2008
<<http://www.municipiodesigchos.com/>>
- Muñoz, Viviana. "Determinación de métodos para producción de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), con fines de propagación y producción comercial." Universidad San Francisco de Quito: Quito, 2004.
- Murashige T, F Skoog, "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures." Physiol. Plantarum. 15 (1962): 473-497.
- National Research Council. Lost Crops of the Inca: Little Known Plants of the Andes with Promise for World-wide Cultivation. Washington (D.C.): National Academy Press, 1989.
- Noé N, L Bonini. "Leaf anatomy of highbush blueberry grown *in vitro* and during acclimatization to *ex vitro* conditions." Biologia Plantarum. 38.1 (1996): 19-25
- Noé N, T Eccher. "Influence of irradiance on *in vitro* growth and proliferation of *Vaccinium corymbosum* (highbush blueberry) and subsequent rooting *in vivo*." Physiologia Plantarum. 91 (1994): 273-275.
- Noé N, T Eccher, E del Signore, A Montoldi. "Growth and proliferation *in vitro* of *Vaccinium corymbosum* under different irradiance and radiation spectral composition." Biologia Plantarum. 41.2 (1998): 161-167.

- Ostrolucká, Mária Gabriela, Gabriela Libiaková, Emília Ondrušková, Alena Gajdošová. "In vitro propagation of *Vaccinium* species." Acta Universitatis Latviensis, Biology 676 (2004): 207-212.
- Pereira, Maria João. "Conservation of *Vaccinium cylindraceum* Smith (*Ericaceae*) by Micropropagation using Seedling Nodal Explants." In Vitro Cell. Dev. Biol. 42 (2006): 65-68.
- Pierik, R.L.M. In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers: Dordrecht, 1987.
- Pospíšilová, J., I Tichá, P Kadleček, D Haisel, S Plzáková. "Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions." Biologia Plantarum 42.4 (1999): 481-497.
- Reed, Barbara M y Ana Abdelnour-Esquivel. "The Use of Zeatin to Initiate in Vitro Cultures of *Vaccinium* Species and Cultivars." HortScience 26.10 (1991): 1320-1322.
- Rowland, LJ y EL Ogden. "Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf sections of highbush blueberry." HortScience 27 (1992): 1127-1129.
- Taji, Acram, PP Klumar y P Lackshmanan. In Vitro Plant Breeding. Hawthorn Press: Binghamton, 2002
- Tetsumura, T et. al. "Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars." Scientia Horticulturae (2008): 1-3.
- Revista Líderes. "El mortiño es un apetitoso regalo de la tierra de la serranía de Ecuador." Revista Líderes 3 Noviembre 2008: 17.
- Stern, Margaret J. "An Inter-Andean Forest Relic: Vegetation Change on Pasochoa Volcano, Ecuador." Mountain Research and Development 15.4 (1995): 339-348.