

Propagación *in vitro* de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae)

Leidy Yanira Rache Cardenal^{1,2} y José Constantino Pacheco Maldonado¹

Recibido em 3/08/2009. Aceito em 8/12/2010

RESUMEN – (Propagación *in vitro* de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae)). Se desarrolló un procedimiento de micropropagación de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* utilizando como explantes primarios ápices caulinares. Durante la fase de establecimiento *in vitro* de explantes se estudió el efecto de los medios MS/3, WPM, AND y el propuesto por Kyte para Blueberry, suplementados con 2-iP más AIA ó BA más AIA. Durante la proliferación de microtallos se evaluó el efecto del medio MS/3 líquido, sólido y en doble fase (una fase líquida sobre una fase solidificada con agar), suplementados con 2-iP más AIA. El enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de microtallos y macollas se indujo utilizando auxinas y/o carbón activado y para el desarrollo de raíces se utilizó un sustrato enriquecido con materia orgánica. El endurecimiento de plántulas se realizó de manera simultánea con el proceso de desarrollo radical. Después de la fase de establecimiento, la media más alta, 4,5, yemas axilares desarrolladas por explante viable, se cuantificó en MS/3 suplementado con 59.05 μ M de 2-iP más 17.13 μ M de AIA. Durante la fase de proliferación de microtallos la media más alta, 7.25, se cuantificó en MS/3 en doble fase. Después de 60 días de endurecimiento el 88-100% de los microtallos enraizaron y reactivaron su crecimiento.

Palabras claves: Bilberry colombiana, micropropagación, cultivo *in vitro*, ápices caulinares

ABSTRACT – (*In vitro* propagation of mature plants of *Vaccinium meridionale* (Ericaceae)). Using stem apex as primary explants, a micropropagation protocol of *Vaccinium meridionale* was established. During establishment phase the effect of the MS/3, WPM, AND and Kyte media, supplemented with 2-iP plus IAA or BA plus IAA was studied. During microshoot proliferation the effect of MS/3 liquid, solid and double phase (the liquid phase in a solidified phase with agar) supplemented with 2-iP plus IAA was evaluated. *In vitro* and *ex vitro* rooting of microshoots and microshoots was accomplished using auxines and/or activated charcoal; for root development a substratum with abundant organic matter was utilized. Plantlet hardening was achieved simultaneously with the radical development process. After establishment phase, the highest quantity of axillary buds/explant was quantified in cultures performed in MS/3 supplemented with 2-iP, 59.05 μ M plus IAA 17.13 μ M. During the microshoot proliferation phase the highest average production was obtained in double phase MS/3. After 60 days of hardening 88-100% of rooted microshoots was obtained; these plantlets showed growth reactivation.

Key words: *Vaccinium meridionale*, Colombian Bilberry, micropropagation, *in vitro* culture, shoot tips

Introducción

Vaccinium meridionale Sw. conocido en Colombia como agraz, pertenece a la familia Ericaceae y se encuentra muy frecuente de forma silvestre; es una especie promisoriosa de gran interés debido a que sus frutos son una fuente importante de azúcares, antioxidantes, vitaminas del complejo B y C y minerales como potasio, calcio, y fósforo (Vallejo 2000; Magnitskiy & Ligarreto 2007; Arjona 2001; Ávila *et al.* 2007; Warnert 1999). Los frutos también se usan para elaborar jugos, mermeladas, dulces, flanes, tortas, helados y vinos y con fines medicinales relacionados con el control de diabetes y de problemas digestivos (Echeverri 2003). Las plantas son utilizadas como fuente de leña para cocción de alimentos y de follaje para uso en floristería; la madera se usa para elaboración de muebles. Es una especie fundamental en procesos de restauración y recuperación de suelos (Echeverri 2003). El agraz se encuentra amenazado principalmente por la deforestación, fragmentación de ecosistemas, por prácticas inadecuadas durante la recolección y sobre cosecha, explotación de tierra de capote, tala de árboles y sobre explotación de las ramas para uso en floristería.

El agraz presenta dificultades para su reproducción sexual y asexual; a pesar de que los frutos contienen un gran número de semillas, los procesos de germinación y desarrollo de plantas son largos y la cantidad de plántulas viables es

baja (Baskin *et al.* 2000). La propagación asexual mediante estacas y acodos muestra resultados poco satisfactorios, debido a los bajos porcentajes de enraizamiento (Vallejo 2000; Magnitskiy & Ligarreto 2007; León 2001).

Vaccinium meridionale es una especie poco estudiada; se conocen algunos reportes relacionados con su distribución (Valencia & Becerra 1995), comercialización (Vallejo 2000; Magnitskiy & Ligarreto 2007), algunas generalidades y germinación de semillas (Valencia 1993; Magnitskiy & Ligarreto 2007), caracterización fisicoquímica y organoléptica de frutos (Ávila *et al.* 2007) y reproducción asexual (Vallejo 2000; Magnitskiy & Ligarreto 2007). Sin embargo, no se han realizado estudios *in vitro* en esta especie. Teniendo en cuenta que existe una gran demanda y un bajo nivel de oferta de frutos (Ávila *et al.* 2007) y que los métodos convencionales de propagación no permiten la obtención de cantidades suficientes de materiales vegetativos para el establecimiento de huertos comerciales, en este trabajo se establece un protocolo para la micropropagación de materiales adultos seleccionados de *Vaccinium meridionale*, como una alternativa efectiva para la propagación clonal de esta especie.

Materiales y métodos

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales –BIOPLASMA– de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja.

¹ Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Biológicas, Laboratorio BIOPLASMA, Tunja, Boyacá, Colombia

² Autor para correspondencia: leidyache@yahoo.com

Localización, selección y establecimiento de material vegetal - Las plantas adultas utilizadas como fuente de propágulos para establecimiento en invernadero y posterior cultivo *in vitro*, se seleccionaron en huertos silvestres localizados en el municipio de Tinjacá – Boyacá. De estas plantas se tomaron rizomas (junto con el suelo acompañante) y se plantaron en condiciones de invernadero. Durante el tiempo de experimentación, los brotes que desarrollaron los rizomas se asperjaron semanalmente con una solución de 2 g·L⁻¹ de Benlate® más 2 g·L⁻¹ de Antracol®.

Cultivo *in vitro* de explantes primarios

Fase de establecimiento - De las plantas desarrolladas en invernadero (Fig. 2A), se tomaron ápices caulinares de 2,0 – 5,0 cm de longitud (Fig. 2B) y, en cámara de flujo laminar, se sometieron al siguiente procedimiento de asepsia superficial: un enjuague con agua destilada más Tween 20 (0,1 % v/v) durante 5 minutos con agitación continua; inmersión en CaOCl₂ al 7% (p/v) durante 20 minutos; tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril durante 5 minutos cada uno. Finalmente, los ápices se mantuvieron hasta su cultivo, en una solución de 100 mg·L⁻¹ de ácido cítrico más 100 mg·L⁻¹ de ácido ascórbico esterilizada por filtración. Antes de la siembra en medio de cultivo, a los ápices caulinares asépticos se les eliminó las hojas (Fig. 2C) y se fraccionaron en segmentos de 2,0 cm; cada segmento se cultivó individualmente en posición horizontal, durante 45 días. En cada tratamiento se cultivaron 30 segmentos caulinares.

En esta fase se evaluó el efecto de los medios de cultivo indicados en la Tab. 1. Cada uno de los cuatro medios se suplementó con 2-iP (2-isopenteniladenina) más AIA (Ácido 3-indolacético, esterilizado por filtración) ó con BA (N⁶ – Benciladenina) más AIA. Los tratamientos ensayados fueron: Medio WPM + 59,05 μM 2iP (T1); WPM +13,3 μM BA (T2); KYTE + 59,05 μM 2iP (T3); KYTE + 13,3 μM BA (T4); ANDERSON (AND) + 59,05 μM 2iP (T5); ANDERSON + 13,3 μM BA (T6); MS + 59,05 μM 2iP (T7); MS +13,3 μM BA (T8). Cada uno de los tratamientos se suplementó con 17,13 μM AIA. Al finalizar esta etapa (después de 45 días de cultivo) se evaluó el efecto de los medios de cultivo sobre: número de explantes viables, desarrollo de yemas axilares, e incidencia de procesos necróticos y contaminación.

Fase de proliferación - Microtallos de longitud ≥ 0,75 cm, con 3,6 yemas axilares en promedio, desarrollados durante la fase de establecimiento, se utilizaron para los ensayos de proliferación en MS/3 sólido, líquido y doble fase (una fase líquida sobre una fase solidificada con agar, Viseur 1987), suplementados con 59,05 μM de 2-iP más 17,13 μM de AIA. Como soporte para los explantes cultivados en medio líquido se utilizaron canastillas de 4,5 cm de diámetro elaboradas con PVC (cloruro de polivinilo) y tela tul (Fig. 2D). La composición del medio sólido y del medio líquido en la doble fase fue la misma a excepción del agar. Después de 45 días de cultivo en cada uno de los tres medios se evaluó: número de yemas desarrolladas por explante y longitud de microtallos. En cada medio se cultivaron 30 microtallos y

el ensayo se realizó por duplicado. Con el fin de estimular el proceso de elongación, microtallos y macollas producidos en los medios de proliferación se subcultivaron en MS/3 sin reguladores de crecimiento y en MS/3 suplementado con 3 g·L⁻¹ de carbón activado. En cada medio se cultivaron 30 microtallos y 30 macollas y el ensayo se realizó por duplicado. Después de 45 días de subcultivo en los medios para elongación se cuantificó la longitud de los microtallos.

Fase de enraizamiento *in vitro* y endurecimiento de plántulas - Para inducción de enraizamiento *in vitro*, microtallos (MI) de longitud ≥ 1,5 cm provenientes de los medios de elongación, se cultivaron en MS/3 suplementado con diferentes auxinas (Tab. 2, tratamientos 1 a 7) y después de 45 días de cultivo, los MI se enjuagaron con agua corriente y se transfirieron a bandejas de poliestireno (21 x 21 x 5.5 cm) con tierra de capote (mantillo de bosque). Las bandejas se colocaron dentro de cajas de vidrio de 50 x 30 x 10 cm, cerradas con plástico extensible; las condiciones del ambiente interior de las cajas fueron 23°C y humedad relativa de 97%. Las cajas se mantuvieron en cuarto de incubación y las bandejas se regaron semanalmente, por aspersión manual. Después de 60 días, el plástico extensible se eliminó de forma progresiva (durante 15 días). Posteriormente, las plántulas se transfirieron a vasos plásticos (de 100 mL de capacidad) con tierra de capote y se llevaron a invernadero (75-85% de humedad relativa, temperatura media diurna 18 °C y nocturna 12 °C).

Fase de enraizamiento *ex vitro* y endurecimiento de plántulas - Para inducción de enraizamiento *ex vitro*, MI de longitud ≥ 1,5 cm y macollas (MA) con 10 MI en promedio, de 0,7 a 2,0 cm de longitud, provenientes de los medios de elongación, se enjuagaron con agua corriente para eliminar el agar adherido a la base; luego, las porciones basales de los MI y las MA se trataron (aplicando pulsos de 2 minutos) con las soluciones de auxinas indicadas en la Tab. 2 (tratamientos 8 a 12). Después de los pulsos, tanto los MI como las MA se manipularon de manera semejante a los MI provenientes del medio de inducción de enraizamiento *in vitro*. En esta etapa se utilizaron 30 MI y 30 MA para cada tratamiento y se cuantificó la viabilidad de plántulas, el porcentaje de MI y MA enraizados, longitud de la raíz y porcentaje de plántulas que reactivaron su crecimiento.

Condiciones generales de cultivo - El pH de todos los medios de cultivo utilizados se ajustó a 5,0 con KOH y/o HCl y se esterilizaron en autoclave a 15 psi y 121°C durante 20 minutos. Todos los cultivos realizados se mantuvieron en cuarto de incubación, a temperatura de 23 ± 1°C, con iluminación continua (70-80 μmol.m²/s) suministrada por lámparas fluorescentes luz de día.

Para el análisis estadístico de los datos se realizó análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confiabilidad del 95%. Para los factores que resultaron estadísticamente significativos se realizó la prueba LSD. Los datos fueron procesados con el paquete estadístico StatGraphic versión 4,0.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo utilizados durante la etapa de establecimiento *in vitro* de segmentos caulinares de *Vaccinium meridionale*. MS: (Murashige & Skoog 1962); MS/3: MS con macroelementos a 1/3 de la concentración original; AND: Anderson 1984 y WPM: (Woody Plant Medium, Lloyd & Brent 1980) modificados y el medio propuesto por Kyte (1987). Datos en mg·L⁻¹.

Componentes	AND	WPM	MS/3	KYTE
Macroelementos				
NH ₄ NO ₃	400	400	550	160
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	556	-	708
KNO ₃	480	-	630	202
KH ₂ PO ₄	-	170	56	408
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	91	152	-
K ₂ SO ₄	-	990	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	123	370
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	380	-	-	-

Microelementos: MS + (en mg·L⁻¹): FeSO₄·7H₂O: 55,6; Na₂EDTA: 74,6; Ácido Nicotínico: 1,0; Tiamina-HCl: 1,0; Piridoxina-HCl: 1,0; Adenina: 80; Sacarosa: 20000; Ácido ascórbico: 100; Agar oxid: 6500.

Tabla 2. Tratamientos ensayados para inducir enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* en microtallos y macollas de *Vaccinium meridionale*. AIA: Ácido 3-indolacético; AIB: Ácido Indolbutírico; ANA: Ácido Naftalenacético. MI: microtallos; MA: macollas.

Tratamientos	Concentración (μM)	Tipo de explante y condiciones de cultivo
E1 AIA	22,84	
E2 AIA	11,42	
E3 AIB	24,60	
E4 AIB	73,5	MI, inducción enraizamiento <i>in vitro</i> .
E5 AIB + carbón activado	24,6 + 3 g·L ⁻¹	
E6 Carbón activado	3 g·L ⁻¹	
E7 Sin reguladores		
E8 ANA	5,37	
E9 AIB	4,9	
E10 ANA	32,22	MI y MA, inducción enraizamiento <i>ex vitro</i> , pulsos de 2 minutos.
E11 AIB	29,52	
E12 Sin reguladores		

Resultados

Material vegetal - El tratamiento de las plantas desarrolladas y mantenidas en invernadero con la solución de Benlate® + Antracol®, fue efectivo para eliminar la mayor parte de hongos superficiales de los explantes primarios. Cuando las plantas no fueron asperjadas, el porcentaje de explantes contaminados alcanzó 80-100%, mientras que cuando las plantas se asperjaron dicho porcentaje disminuyó hasta 20%. **Etapa de establecimiento** - Durante esta etapa se evidenció un aumento progresivo del porcentaje de explantes necróticos a medida que transcurrió el tiempo de cultivo; cuantificándose los mayores porcentajes, 70%, en los explantes cultivados en WPM y Anderson suplementados con 59,05 μM de 2-iP más 17,13 μM de AIA (Fig. 1, T1 y T5); los porcentajes más bajos, 10 y 20%, se cuantificaron en MS/3 con 2-iP más AIA y BA más AIA (T7 y T8, Fig. 1). Estos resultados muestran que los

procesos de necrosis en tejidos de *Vaccinium meridionale* están influenciados tanto por la composición y concentración de macroelementos de los medios de cultivo como por su interacción con la citoquinina adicionada. Durante esta fase se observó que los segmentos caulinares cultivados en MS/3 con 59,05 μM de 2-iP más 17,13 μM de AIA (T7), expresaron una considerable capacidad para reactivar y desarrollar yemas axilares (Tab. 3), cuantificándose en ellos la mayor cantidad promedio de yemas reactivadas/explante, 4,5; mientras que en los segmentos caulinares cultivados en MS/3 y en el medio propuesto por Kyte con 13,3 μM de BA más 17,13 μM de AIA (T8 y T4), se cuantificaron medias de 1,4 y 1,2 yemas reactivadas/explante viable, respectivamente. En WPM (T1) y AND (T5) suplementados con 59,05 μM de 2-iP más 17,13 μM de AIA, aunque se cuantificaron los porcentajes más altos (70%) de explantes viables, durante 45 días de cultivo no se observó reactivación del crecimiento

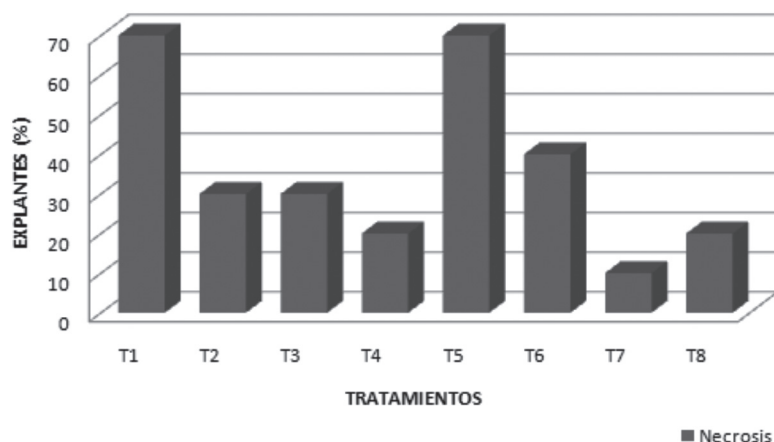


Figura 1. Necrosis de explantes primarios de *Vaccinium meridionale*, durante la fase de establecimiento *in vitro*. Medio WPM+59,05 2iP+17,13 μ M AIA (T1); WPM+13,3 μ M BA+17,13 μ M AIA (T2); KYTE+59,05 μ M 2iP+17,13 μ M AIA (T3); KYTE+13,3 μ M BA+17,13 μ M AIA (T4); AND+59,05 μ M 2iP+17,13 μ M AIA (T5); AND+13,3 μ M BA+17,13 μ M AIA (T6); MS+59,05 μ M 2iP+17,13 μ M AIA (T7); MS +13,3 μ M BA+17,13 μ M AIA (T8).

de las yemas axilares (Tab. 3).

Fase de proliferación - Con base en los resultados obtenidos en la fase de establecimiento, se determinó que el medio más aconsejable para continuar multiplicando brotes *in vitro* era MS/3 suplementado con 59,05 μ M de 2-iP más 17,13 μ M de AIA (T7). Durante la fase de proliferación, en los cultivos realizados en medio T7 sólido, líquido y doble fase, se observó que los explantes cultivados en doble fase reactivaron mayor cantidad de yemas y desarrollaron mayor número de microtallos axilares (Fig. 2E) que los explantes cultivados en los medios sólido y líquido (Fig. 2F y 2G, respectivamente). Así mismo, se cuantificó 7,25 microtallos/explante en promedio (Tab. 4), con longitud media de 0,9 cm, en medio doble fase, seguidos por 5,91 con longitud promedio de 0,59 cm en medio líquido. En medio sólido se cuantificó menor media y longitud promedio de microtallos desarrollados. Los resultados obtenidos (Tab. 5; Fig. 2H), indican que el ensayo realizado para estimular la elongación de los microtallos fue efectivo, cuantificándose el mayor incremento en longitud, $\bar{X} = 2,54$ cm, en microtallos cultivados en MS/3 suplementado con 3 g·L⁻¹ de carbón activado y un ligero aumento, 1,66 cm, en microtallos cultivados en MS/3 sin reguladores de crecimiento.

Enraizamiento *in vitro* de microtallos y endurecimiento de plántulas - Durante la fase de inducción *in vitro* de enraizamiento, los MI cultivados en MS/3 con las diferentes auxinas y suplementos adicionados, no formaron estructuras radicales visibles; sin embargo, al final de la fase de endurecimiento, después de 50 días de transferidos los MI inducidos a tierra de capote, se cuantificó (Tab. 6) 100% de MI enraizados en aquellos estimulados con 22,84 y 11,42 μ M de AIA (E1 y E2) y con 24,60 μ M de AIB más 3 g·L⁻¹ de carbón activado (E5, Fig. 2I). Con respecto a longitud de raíz (Tab. 6), los valores medios más elevados, 2,9, 2,32 y 2,25 se cuantificaron en MI inducidos en presencia de 3 g·L⁻¹ de carbón activado (E6), 73,5 μ M de AIB (E4) y 22,84

μ M de AIA (E1).

Enraizamiento *ex vitro* y endurecimiento de plántulas - Los datos obtenidos sobre enraizamiento *ex vitro* de MI y MA (Fig. 2I, Tab. 7) muestran que los porcentajes más altos, 88 y 56%, se cuantificaron en MI sin tratamiento de inducción rizogénica y en MI tratados con pulsos de 2 minutos con 5,37 μ M de ANA, respectivamente. Así mismo, los porcentajes más altos 91,3% y 71,4% de MA enraizadas se cuantificaron en los tratamientos con pulsos de 4,90 μ M de AIB y 5,37 μ M de ANA, respectivamente. En MI tratados con pulsos de 32,22 μ M de ANA (E10), sin reguladores (E12) y con 5,37 μ M de ANA (E8) se cuantificó 1,89, 1,82 y 1,5 cm de longitud media de la raíz. Sin embargo, en MA la longitud media de la raíz aumentó en casi todos los tratamientos, excepto en el E9 (4,90 μ M de ANA) en el que la longitud media de la raíz fue 1,14 cm. Aunque inducir enraizamiento *ex vitro* es más fácil que *in vitro*, solo el 58% de las plántulas enraizadas reactivaron su crecimiento en invernadero después de 90 días; mientras que induciendo enraizamiento *in vitro* se alcanzó 88-100% de plántulas aclimatizadas con evidente reactivación de crecimiento después de 90 días de endurecimiento (Fig. 2J 1 y 2).

Discusión

Cuando los explantes primarios proceden de plantas adultas, tanto el establecimiento de cultivos como la proliferación *in vitro* de microtallos son etapas difíciles de realizar en la mayoría de las especies leñosas; dicha dificultad se debe, en gran parte, al alto grado de contaminación exógena y endógena, así como la escasa reactividad *in vitro* de los tejidos tomados de plantas adultas de campo (Trippi 1982); al respecto, Jaakola *et al.* (2001) indican que la iniciación del crecimiento *in vitro* de explantes de *Vaccinium* es muy limitada cuando se utilizan plantas de campo y, según Brisette *et al.* (1990) y Reed & Abdelnour (1991), la causa principal es el alto grado de contaminación. En este trabajo

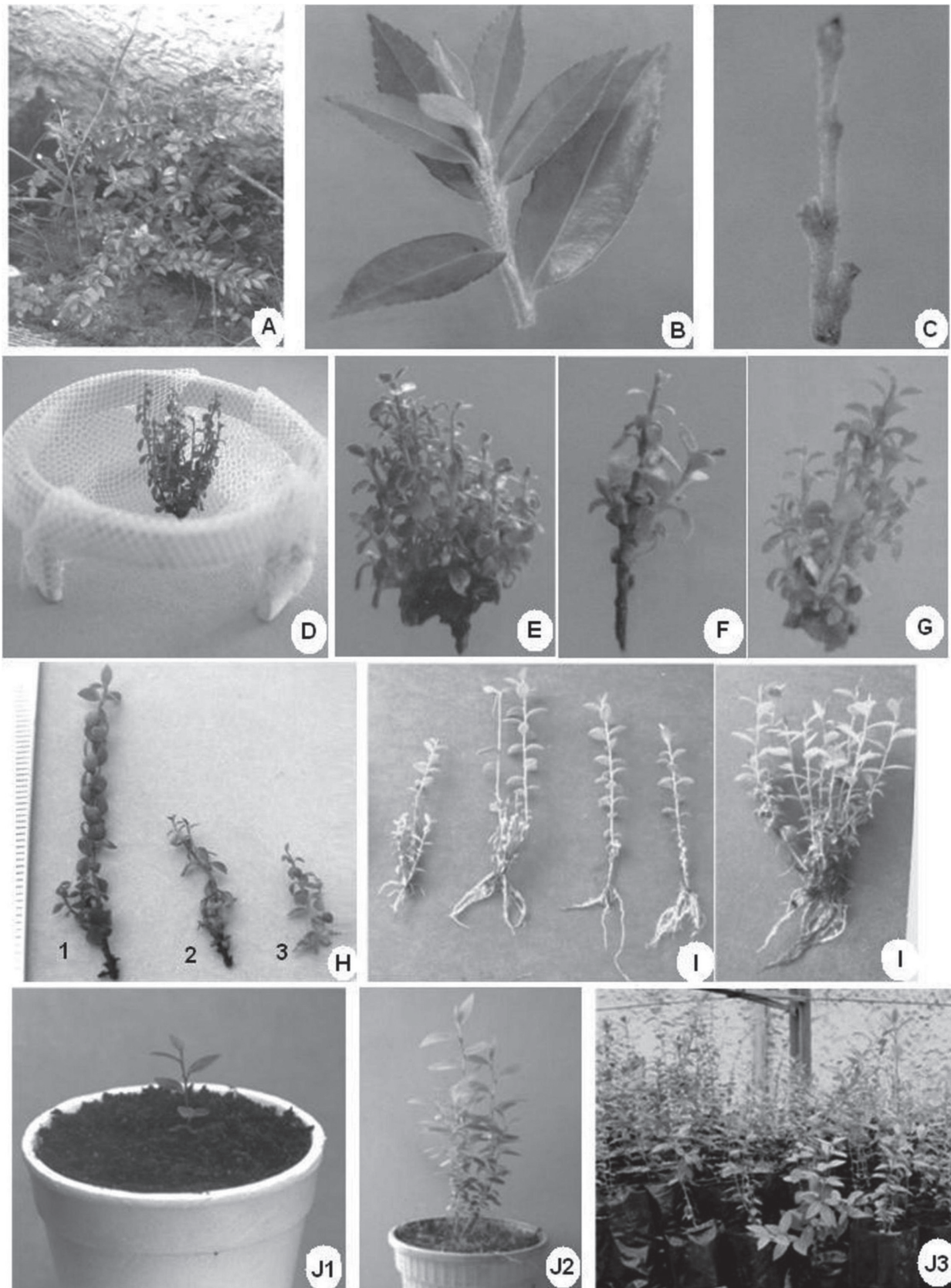


Figura 2. Micropropagación de *Vaccinium meridionale*. A. Planta adulta, fuente de explantes primarios. B. Ápice caulinar. C. Explante primario. D. Soporte para explantes cultivados en medio líquido. E-G: Microtallos con yemas axilares en desarrollo, cultivados en MS/3 doble fase (E) en sólido (F) y líquido (G). H. Microtallos elongados en MS/3 suplementado con carbón activado (1), sin reguladores (2) y con 2-iP y AIA (3). I. Microtallos y macollas enraizados. J. Plántulas aclimatizadas después de 90 días (1 y 2) y después de 180 días.

Tabla 3. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la reactivación del crecimiento de yemas axilares de segmentos caulinares de *Vaccinium meridionale*. Medio WPM+59,05 2iP+17,13 μ M AIA (T1); WPM+13,3 μ M BA+17,13 μ M AIA (T2); KYTE + 59,05 μ M 2iP+17,13 μ M AIA (T3); KYTE+13,3 μ M BA+17,13 μ M AIA (T4); AND+59,05 μ M 2iP+17,13 μ M AIA (T5); AND+13,3 μ M BA+17,13 μ M AIA (T6); MS+59,05 μ M 2iP+17,13 μ M AIA (T7); MS +13,3 μ M BA+17,13 μ M AIA (T8). EV: Explantes viables; SC: Segmento caulinar; \bar{x} /EV: Promedio por explante viable; LM: Longitud de microtallos; (\bar{x}): Promedio; \pm Desviación estándar. Promedios con una misma letra no difieren estadísticamente, según prueba LSD ($P=0,05$).

Tratamientos	EV (%)	Yemas axilares/SC (\bar{x})	Yemas reactivadas \bar{x} /EV	LM (\bar{x} cm)
T1	70	4,8	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
T2	50	6,6	0,6 \pm 0,89b	1,53 \pm 0,85cd
T3	60	4,6	0,83 \pm 1,16b	0,94 \pm 0,41b
T4	50	4,2	1,2 \pm 1,09b	1,4 \pm 0,42bcd
T5	70	3,4	0,0 \pm 0,0a	0,0 \pm 0,0a
T6	60	4,8	0,66 \pm 1,03b	0,95 \pm 0,28bc
T7	40	6,0	4,5 \pm 1,91c	0,99 \pm 0,49b
T8	50	6,0	1,4 \pm 1,34b	1,54 \pm 0,27d

Tabla 4. Microtallos de *Vaccinium meridionale* desarrollados durante la fase de proliferación en medio MS/3 líquido, sólido y en doble fase suplementado con 59,05 μ M de 2-iP (2-isopenteniladenina) + 17,13 μ M de AIA (Ácido 3-indolacético). (\bar{x}): Promedio; EP: Explante primario; \pm Desviación estándar. Promedios con una misma letra no difieren estadísticamente, según prueba LSD ($P=0,05$).

Medio	Yemas/EP (\bar{x})	Microtallos desarrollados	
		\bar{x}	Longitud (\bar{x} cm)
Líquido	12,1	5,91 \pm 4,16b	0,59 \pm 0,27a
Sólido	9,2	3,0 \pm 1,65a	0,49 \pm 0,32a
Doble fase	10,3	7,25 \pm 2,80b	0,90 \pm 0,06b

Tabla 5. Longitud de microtallos de *Vaccinium meridionale* después de la fase de elongación en diferentes medios de cultivo. (\bar{x}): Promedio; \pm Desviación estándar. MS/3: Medio Murashige & Skoog (1962) con macroelementos a 1/3 de la concentración original; 2-iP: 2-isopenteniladenina; AIA: Ácido 3-indolacético. Promedios con una misma letra no difieren estadísticamente, según prueba LSD ($P=0,05$).

Medio para elongación	Longitud microtallos
	(\bar{x} cm)
MS/3 + 2-iP (59,05 μ M) + AIA (17,13 μ M)	1,19 \pm 0,33a
MS/3+ Carbón Activado (3 g·L ⁻¹)	2,54 \pm 0,71c
MS/3	1,66 \pm 0,53b

Tabla 6. Enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Vaccinium meridionale*. Después de 45 días de inducción *in vitro* de enraizamiento, los microtallos se transfirieron a tierra de capote en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa. Después de 60 días las plántulas se llevaron a invernadero en nuevas condiciones de cultivo. AIA: Ácido 3-indolacético; AIB: Ácido Indolbutírico; CA: Carbón activado; MIE: Microtallos enraizados; (\bar{x}): Promedio; \pm Desviación estándar. Promedios con una misma letra no difieren estadísticamente, según prueba LSD ($P=0,05$).

Tratamiento	Fase de inducción enraizamiento (μ M)	Fase de expresión	
		MIE (%)	Longitud raíz (\bar{x} cm)
E1	AIA (22,84)	100	2,25 \pm 0,68b
E2	AIA (11,42)	100	2,08 \pm 0,74b
E3	AIB (24,60)	50	1,89 \pm 0,53ab
E4	AIB (73,5)	90	2,32 \pm 0,48bc
E5	AIB (24,60)+CA (3 g·L ⁻¹)	100	1,33 \pm 0,89a
E6	CA (3 g·L ⁻¹)	90	2,9 \pm 0,75c
E7	Sin reguladores	88	1,7 \pm 0,74ab

Tabla 7. Enraizamiento *ex vitro* de microtallos y macollas de *Vaccinium meridionale*. Después de aplicar pulsos de 2 minutos con soluciones de auxinas a las porciones basales de MI y MA se cultivaron durante 45 días en tierra de capote en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa y después de 60 días las plántulas se llevaron a invernadero en nuevas condiciones de cultivo. ANA: Ácido Naftalenacético; AIB: Ácido Indolbutírico; MIE: Microtallos enraizados; MAE: Macollas enraizadas; (\bar{x}): Promedio; \pm Desviación estándar. N.S.: No significativo. Promedios con una misma letra no difieren estadísticamente, según prueba LSD ($P=0,05$).

Tratamiento	Reguladores (μ M)	MIE (%)	Longitud raíz (\bar{x} cm)	MAE (%)	Longitud raíz (\bar{x} cm)
E8	ANA (5,37)	56	1,5 \pm 0,65	71,4	2,38 \pm 0,93bc
E9	AIB (4,90)	0	0,0 \pm 0,0	91,3	1,14 \pm 0,48a
E10	ANA (32,22)	16	1,89 \pm 0,65	46,2	2,93 \pm 0,54c
E11	AIB (29,52)	0	0,0 \pm 0,0	35,3	2,21 \pm 0,67b
E12	Sin reguladores	88	1,82 \pm 0,82	50	2,1 \pm 0,9b
			N.S.		

se observó que los explantes de *Vaccinium meridionale* tomados de plantas de campo y cultivados *in vitro* sufren pardeamiento y mueren; la muerte de estos explantes se debe, en gran parte, a las drásticas condiciones de asepsia que deben ser aplicadas para eliminar los contaminantes superficiales. Además, el establecimiento de plantas adultas en invernadero y la aspersión periódica con Benlate y Antracol, permitió controlar la presencia de contaminantes fúngicos, produciendo una evidente disminución de la contaminación de explantes primarios.

Teniendo en cuenta el tipo de explante a cultivar, se han utilizado diferentes agentes desinfectantes y tiempos de exposición para establecer *in vitro* tejidos de diferentes especies de *Vaccinium*. En este trabajo se observó que el tratamiento con CaOCl_2 al 7% (p/v) durante 20 minutos permitió obtener segmentos caulinares de *Vaccinium meridionale* libres de contaminantes superficiales. Jaakola *et al.* (2001) también utilizó CaOCl_2 al 6% durante 10 minutos para asepsia superficial de segmentos caulinares de *Vaccinium myrtillus* y *Vaccinium vitis-idaea* y obtuvo explantes superficialmente asépticos para establecimiento de cultivos. En otros trabajos se han utilizado diferentes productos para asepsia superficial de explantes; Debnath & McRae (2001) utilizaron hipoclorito de sodio a 0,787% (15% de blanqueador comercial) durante 25 minutos para asepsia de explantes tomados de plantas jóvenes de *Vaccinium macrocarpon* y Ostrolucká *et al.* (2007), utilizaron bicloruro de mercurio al 0,1%, durante 6 minutos, para asepsia de microtallos con yemas dormantes tomados de plantas adultas de *Vaccinium corymbosum*.

Con respecto a la posición de los explantes en el medio de cultivo, se observó que la posición horizontal, respecto a la vertical, de manera evidente afectó la estimulación y desarrollo de yemas axilares. Esta respuesta se debe a que la posición horizontal de los explantes permite que las yemas axilares queden en contacto directo con los nutrientes y reguladores de crecimiento del medio de cultivo, tal como lo ha indicado Debnath (2005).

Los medios Anderson y WPM suplementados con 2-iP más AIA no facilitaron la inducción y desarrollo de yemas axilares de ápices caulinares adultos de *Vaccinium meridionale*; probablemente, la concentración de algunas sales presentes en estos medios, así como su interacción con la citoquinina, crean un ambiente inhibitorio para la reactivación de las yemas. Las yemas inhibidas sufrieron procesos necróticos y murieron; observaciones similares fueron reportadas por Morley *et al.* (1992) en *Vaccinium corymbosum*, especie en la que observaron pardeamiento y necrosis marginal en hojas adultas cuando fueron cultivadas en medios con bajos niveles de sales; mientras que al incrementar dichos niveles ocurrieron los mismos procesos pero en hojas jóvenes. Además, Ballinger (1962) indicó que en *Vaccinium corymbosum* no existe un mecanismo de exclusión de sales cuando se alcanzan niveles tóxicos; esta apreciación fue confirmada por Morley *et al.* (1992). Por su parte Debnath & McRae (2001), en trabajos con *Vaccinium vitis-idaea* utilizaron WPM suplementado con 2-iP y cuantificaron una baja tasa de multiplicación de brotes en comparación con la cuantificada en MS; mientras que González *et al.* (2000) establecieron exitosamente cultivos *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* a partir de segmentos nodales, en medio WPM con 25 mM de 2-iP. Reed & Abdelnour (1991) utilizaron WPM modificado suplementado con zeatina (18,24 μ M) y establecieron *in vitro* ápices caulinares de *Vaccinium corymbosum*. Además, Kyte (1987) para *Rhododendron spp.*, y Ostrolucká *et al.* (2007) para *Vaccinium corymbosum* utilizaron el medio de Anderson (MS modificado) para el desarrollo de explantes y reportaron que es factible obtener de 3 a 4 hojas por explante después de 6 semanas y 10,16 a 15,23 brotes de *Vaccinium corymbosum* en medio suplementado con 9,12 μ M de zeatina.

En los ensayos para establecimiento de explantes realizados en este trabajo, la reactivación y desarrollo de yemas axilares fue más efectiva en explantes cultivados en MS/3 suplementado con 2-iP más AIA; este medio contiene una menor concentración de sulfato de magnesio con respecto

a la concentración en AND y WPM. Además, en MS/3 con 2-iP se cuantificó mayor número de yemas reactivadas que en MS/3 con BA, mientras que en el medio propuesto por Kyte, el número de yemas reactivadas fue mayor con BA que con 2-iP. En WPM y Anderson el 2-iP inhibió la reactivación de yemas, mientras que el BA si estimuló dicha reactivación. Estas observaciones indican que no solo la composición del medio de cultivo afecta el desarrollo de yemas, sino que, además, tanto el tipo de citoquinina, como la concentración, interactúan afectando de manera directa la inducción de crecimiento y desarrollo de yemas axilares en explantes de *Vaccinium meridionale*. En este contexto, Ostrolucká *et al.* (2007) afirman que la capacidad de regeneración de los tejidos es altamente dependiente del cultivar, el tipo de citoquinina y la concentración utilizada, para la regeneración de brotes de *Vaccinium corymbosum*.

Con respecto a procesos de proliferación, en diferentes especies de *Vaccinium* se ha utilizado con éxito el 2-iP a concentraciones elevadas. En este trabajo, 59,05 μM de 2-iP fue una concentración efectiva para reactivación y proliferación de yemas axilares; Marcotrigiano & McGlew (1991) sugirieron que altos niveles de esta fitohormona son óptimos para proliferación de brotes de *Vaccinium macrocarpon* y, Pereira (2006) obtuvo un incremento en el número de brotes por explante en *Vaccinium cylindraceum* a medida que incrementó la concentración de 2-iP (0 – 73,8 μM). Así mismo, para explantes de *Vaccinium myrtillus* una concentración de 49,2 μM de 2-iP fue más efectiva para iniciar el crecimiento, aunque para explantes de *Vaccinium vitis-idaea* fueron favorables concentraciones más bajas (9,8-24,6 μM) de 2-iP (Jaakola *et al.* 2001). Marcotrigiano & McGlew (1991) y Smagula & Harker (1997) también sugirieron utilizar altos niveles de 2-iP para proliferación *in vitro* de brotes de *Vaccinium macrocarpon*, de igual manera que Nickerson (1978), Frett & Smagula (1983) y Brisette *et al.* 1990, citados por Debnath & McRae (2001) para *Vaccinium angustifolium* y Zimmerman & Broome (1979; 1980) para *Vaccinium corymbosum* L. Sin embargo, Jaakola *et al.* (2001) indican que al combinar el 2-iP con una auxina se puede presentar desarrollo de callos, pardeamiento y muerte posterior del explante; estas indicaciones no concuerdan con lo observado en este trabajo puesto que la citoquinina siempre se adicionó a los medios de cultivo combinada con una auxina y los explantes no formaron callo.

Los ciclos de proliferación de *Vaccinium meridionale* tardaron entre 6 y 9 semanas de cultivo; datos similares fueron obtenidos por Jaakola *et al.* (2001), quienes determinaron que para la multiplicación de explantes de *Vaccinium myrtillus* y *Vaccinium vitis-idaea*, usualmente son necesarias 5 a 8 semanas de cultivo.

La concentración de 2-iP utilizada en este trabajo, 59,05 μM , inhibió la elongación de los brotes de *Vaccinium meridionale*. Datos similares, producción de brotes cortos con pocas hojas, fueron reportados por Debnath & McRae (2001) en *Vaccinium macrocarpon*, cuando utilizaron

concentraciones elevadas de 2-iP (> 49,21 μM). Pereira (2006) en *Vaccinium cylindraceum* observó aumento del número de brotes regenerados, pero disminución tanto del número de nudos por brote como en la longitud de los brotes regenerados, cuando las concentraciones de 2-iP incrementaron de 12,3 a 73,8 μM . Debnath & McRae (2001), reportaron que altas concentraciones de esta fitohormona inhiben la elongación de brotes en cultivos de *Vaccinium macrocarpon*. Debnath (2003) en ensayos con N-fenil N'-1,2,3-tidiazol-5-il úrea (TDZ) y Zeatina obtuvo un incremento en el número de yemas adventicias pero sin elongación, concluyendo que las citoquininas comúnmente estimulan la proliferación de brotes e inhiben su elongación. En este trabajo se observó que los microtallos de *Vaccinium meridionale* elongaron cuando se cultivaron en MS/3 suplementado con 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbón activado. Además, se observó que en medio sin reguladores de crecimiento la elongación de los microtallos fue escasa, contrastando con los datos obtenidos en *Vaccinium macrocarpon*, Qu *et al.* (2000) y *Vaccinium corymbosum*, Cao & Hammerschlag (2000) en los cuales los brotes adventicios regenerados a partir de explantes de hoja elongaron en medio basal libre de reguladores de crecimiento.

La inducción de enraizamiento de microtallos de 1,5 cm de longitud mediante la aplicación de pulsos de 2 minutos, con 4,90 y 29,52 μM de AIB, no tuvo éxito; probablemente, esta respuesta está influenciada por la longitud de los microtallos, la concentración de la auxina, el tiempo de exposición y la especie utilizada para este ensayo. Ostrolucká *et al.* (2007), utilizando brotes de *Vaccinium corymbosum* de 15-20 cm y tratándolos con una solución de 3,94 μM de AIB durante 2-3 minutos, obtuvieron 80% de enraizamiento; Debnath (2003; 2005) utilizó brotes de *Vaccinium vitis-idaea* de 2-3 y 3-4 cm de longitud y los trató con una solución de 39,4 mM de AIB y 80 a 90% de los brotes enraizaron después de 4 semanas de cultivo en turba-perlita, 2:1. Jaakola *et al.* (2001) utilizó brotes de *Vaccinium myrtillus* y *Vaccinium vitis-idaea* de 3 a 5 cm de longitud y, sin tratamiento hormonal ó con inmersión durante 5 minutos en una solución de 2,07 mM de AIB, obtuvo 80% de enraizamiento.

De manera evidente, para *Vaccinium meridionale*, la inducción *in vitro* de enraizamiento de microtallos fue más favorable que la inducción mediante pulsos con soluciones de AIB (Tab. 6 y 7). Aunque las concentraciones de AIB utilizadas para inducir enraizamiento *in vitro* fueron altas no inhibieron el desarrollo radical, alcanzándose cerca de 90% de microtallos enraizados cuando, después del periodo de inducción, se transfirieron a tierra de capote. Porcentajes similares de enraizamiento se cuantificaron cuando microtallos elongados en medio con carbón activado se transfirieron al mismo sustrato. Estos resultados difieren de los obtenidos por Ostrolucká *et al.* (2007) quienes cuantificaron 80-95% de enraizamiento *in vitro* en medio AND suplementado con 3,94 μM de AIB y 0,8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbón activado y, con los obtenidos por Jaakola *et al.* (2001),

quienes cultivaron brotes *Vaccinium myrtillus* y *Vaccinium vitis-idaea* en medio MS con 0,49 μM de IBA y obtuvieron 81,3% de enraizamiento.

Los altos porcentajes (88 y 90%) de microtallos que enraizaron en medio sin reguladores y suplementado con 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbón activado, respectivamente, indican que es posible suprimir el uso de auxinas para inducir rizogénesis en *Vaccinium meridionale*. Datos similares fueron reportados por Debnath & McRae (2001) quienes utilizaron brotes de *Vaccinium macrocarpon* de 1-1,5 cm de longitud, los cultivaron en medio sin reguladores de crecimiento y obtuvieron 95-100% de brotes enraizados después de 4 semanas de cultivo. Así mismo, Shibli & Smith (1996) alcanzaron 40% de microtallos de *Vaccinium myrtillus* enraizados en medio libre de reguladores de crecimiento y Pereira (2006) en *Vaccinium cylindraceum* obtuvo 21,3% de brotes enraizados en medio libre de reguladores de crecimiento después de 12 semanas.

El desarrollo de un sistema radical vigoroso en tierra de capote durante la etapa de aclimatización, favoreció la obtención de plántulas con crecimiento activo y que soportan exitosamente el estrés producido por las condiciones propias del proceso de endurecimiento. Debnath (2003) y Debnath & McRae (2001) consiguieron aclimatizar plantas de *Vaccinium vitis idaea* y de *Vaccinium macrocarpon* utilizando cubetas que colocaron en una cámara húmeda con un vaporizador (22 \pm 2°C, humedad 95%, PPF = 55 $\text{umolm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16 horas de fotoperiodo); el proceso lo realizaron disminuyendo gradualmente la humedad durante 2-3 semanas en condiciones de invernadero.

En lo relacionado con la viabilidad de las plántulas obtenidas, en este trabajo se alcanzó 88-100% de plántulas viables después de la etapa de endurecimiento, cuando el enraizamiento de microtallos se indujo *in vitro*; además, se observó que aunque la apariencia de las plántulas fue normal, inicialmente su tasa de crecimiento es baja, requiriéndose 3 a 4 meses para obtener plántulas endurecidas de 20 a 30 cm de longitud (Fig. 2J3). Porcentajes semejantes, 80-90% de plantas endurecidas en cubetas con turba y perlita 2:1 (v/v), fueron obtenidos por Ostrolucká *et al.* (2007).

Agradecimientos

Los autores del trabajo expresan sus agradecimientos a la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia-Dirección de Investigaciones y al Gobierno Municipal de Tinjacá-Boyacá (Colombia) por el apoyo financiero para el desarrollo de esta investigación. Así mismo agradecen al profesor Alfonso Jiménez por la traducción al portugués y a los integrantes del Grupo de Investigación BIOPLASMA-UPTC por su continua colaboración.

Referencias bibliográficas

Anderson, W.C. 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *Journal of American Society for Horticultural Science* 109: 343-347.

Arjona, B. 2001. El mortuño o agraz (*Vaccinium meridionale*, Ericaceae): como planta promisoría en la región del Parque Arví (Antioquia, Colombia). In: Seminario de Plantas Promisorias, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional, Seccional Medellín.

Ávila, H.; Cuspoca, J.; Fischer, G.; Ligarreto, G. & Quicazán, M. 2007. Caracterización fisicoquímica y organoléptica del fruto de agraz (*Vaccinium meridionale* Sw) almacenado 1 a 2 °C. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 60(2): 4179-4193.

Ballinger, W.E. 1962. Studies of sulfate and chloride ion effects upon Wolcott blueberry growth and composition. *Proceedings of American Society for Horticultural Science* 80: 331-339.

Baskin, C.; Milberg, P.; Andersson, L. & Baskin, J. 2000. Germination studies of three dwarf shrubs (*Vaccinium*, Ericaceae) of northern hemisphere coniferous forests. *Revue Canadienne Journal Botanique* 78(12): 1552-1560.

Brisette, L.; Tremblay, L. & Lord, D. 1990. Micropropagation of lowbush blueberry from mature field-grown plants. *Horticultural Science* 25: 349-351.

Cao, X. & Hammerschlag, F.A. 2000. Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry. *Horticultural Science* 35: 945-947.

Debnath, S. 2003. Improved shoot organogenesis from hypocotyl segments of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 39: 490-495.

Debnath, S. 2005. Effects of carbon source and concentration on development of lingonberry (*Vaccinium vitis - idaea* L.) shoots cultivated *in vitro* from nodal explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41: 145-150.

Debnath, S. & McRae, K. 2001. An efficient *in vitro* shoot propagation of Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) by axillary bud proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 37: 243-249.

Echeverri, A. 2003. *Conozcamos y Usemos el Mortuño*. Medellín, CORANTIOQUIA.

Frett, J. & Smagula, J. 1983. *In vitro* shoot production of lowbush blueberry. *Canadian Journal Plant Science* 63: 467-472.

González, M.; López, M.; Valdes, E. & Ordas, J. 2000. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. *Annals of Applied Biology* 137(1): 73-78.

Jaakola, L.; Tolvanen, A.; Laine, K. & Hohtola, A. 2001. Effect of N⁶-isopentenyladenine concentration on growth initiation *in vitro* and rooting of bilberry and lingonberry microshoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66: 73-77.

Kyte, L. 1987. *Plants from test tubes. An introduction to micropropagation*. Hong Kong, Timber Press, Inc.

León, A. 2001. *Cultivo de arándanos: Blueberries*. Guía Frutihortícola. Santiago de Chile, Librería Santa Fe - Fundación Chile.

Lloyd, G. & Brent, McC. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proceedings International Plant Propagators' Society* 30: 421-427.

Magnitskiy, S.V. & Ligarreto, G.A. 2007. El efecto del nitrato de potasio, del ácido giberélico y del ácido indolacético sobre la germinación de semillas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 1(2): 137-141.

Marcotrigiano, M. & McGlew, S. 1991. A two-stage micropropagation system for cranberries. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 911-916.

Morley, S.M.; Stephen, F.C. & Reinhard, F.M. 1992. Effects of Na₂SO₄, K₂SO₄ and KCl on growth and ion uptake of callus cultures of *Vaccinium corymbosum* L. cv. Blue Crop. *Annals of Botany* 69: 459-465.

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 437-497.

Nickerson, N. 1978. *In vitro* shoot formation in lowbush blueberry seedling explants. *Horticultural Science* 13: 698.

Ostrolucká, M.G.; Gajdošová, A.; Libiaková, G.; Hrubíková, K. y Bežo. 2007. Protocol for micropropagation of selected *Vaccinium* spp. Pp. 445-455. In: Jain, S.M. & Häggman, H. (eds). *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht, Springer.

Pereira, M.J. 2006. Conservation of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae) by micropropagation using seedling nodal explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 42: 65-68.

Qu, L.; Polashock, J. & Vorsa, N. 2000. A high efficient *in vitro* cranberry regeneration system using leaf explants. *Horticultural Science* 35: 948-952.

- Reed, B.M. & Abdelnour, E.A. 1991. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. **Horticultural Science** 26: 1320-1322.
- Shibli, R.A. & Smith, M. 1996. Direct shoot regeneration from *Vaccinium pahlae* (Othelo) and *V. myrtillos* (bilberry) leaf explants. **Horticultural Science** 31: 1225-1228.
- Smagula, J.M. & Harker, J. 1997. Cranberry micropropagation using a lowbush blueberry medium. **Acta Horticulturae** 446: 343-347.
- Trippi, V.S. 1982. **Ontogenia y senilidad en plantas**. Córdoba. Universidad Nac. Córdoba.
- Valencia, M. 1993. Notas sobre la morfología, anatomía y germinación del agraz (*Vaccinium meridionale Sw*). **Agronomía Colombiana** 10(2): 151-159.
- Valencia, M. & Becerra, N. 1995. Anatomía del fruto del agraz (*Vaccinium meridionale Sw*). **Acta Biológica Colombiana** 9: 159-172.
- Vallejo, D.A. 2000. **Fomento al mortifio (*Vaccinium meridionale Sw*): como especie promisoría del Parque Regional Arví**. Medellín: CORANTIOQUIA.
- Viseur, J. 1987. Micropropagation of pear, *Pyrus communis* L., in a double-phase culture medium. **Acta Horticulturae** 212: 117-124.
- Warnert, J. 1999. Growing blueberry frustrates farmers, but open doors. **California Agriculture** 53(6): 10.
- Zimmerman, R.H. & Broome, O.C. 1979. Propagation of blueberries through tissue culture. **Horticultural Science** 14: 477.
- Zimmerman, R.H. & Broome, O.C. 1980. **Blueberry micropropagation**. Proc. Conf. on Nursery Prod. of Fruit Plants through Tiss. Cult. Applications and Feasibility, U.S. Dep. Agric. Sci. and Ed. Adm. ARR-NE. 11: 44-47.