



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN  
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
CIIDIR- MICHOACÁN**

**"ORGANOGENESIS *in vitro* DE ARÁNDANO *Vaccinium  
corymbosum* L."**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN:**

**PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE**

**P R E S E N T A:**

**HUGO VICTORIANO MORA**

**Director de Tesis: Dr. José Venegas González**

**Codirectora de Tesis: Dra. Martha Elena Pedraza Santos**

**Jiquilpan, Michoacán.**

**Marzo 2010**

## **Agradecimientos**

### **AL SIP – IPN**

Por ser una Institución comprometida con la investigación y aplicación de conocimientos científicos.

### **AL CIIDIR-MICHOACÁN**

Por ser el Centro de Investigación que nos dio la oportunidad de recibir conocimientos y de promover el desarrollo de nuestras regiones.

### **A LA FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA URUAPAN MICHOACÁN**

Por las facilidades otorgadas para la realización de los trabajos experimentales en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

### **AL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE ZAMORA**

Por ser una institución comprometida con la preparación continua de sus trabajadores y por el apoyo real y sincero.

### **AL COECYT MICHOACAN**

Por su apoyo económico para la adquisición de material vegetal que fue indispensable para la investigación.

### **A MI FAMILIA**

A mi padre Alfredo Victoriano por sus palabras de aliento para seguir adelante; a mi madre Emilia Mora, por su capacidad para dar ánimos sin necesidad de palabras; a mi hermano César y Alfredo, porque son parte de mí; a mi esposa Hilda Chávez, por su enorme cariño y comprensión, por su compañía en los momentos más importantes.

## **A MIS AMIGOS**

Alejandro, Ana, Patricia, Adriana, Luz María, por el apoyo brindado a lo largo de la maestría. En especial a Alejandro por el apoyo incondicional, por las ideas, por su visión, por el ejemplo que me ha dado para prepararme y seguir adelante.

## **Reconocimientos**

A la Doctora Martha Pedraza Santos, por su asesoría tan puntual y profesional, pero sobre todo por su paciencia y comprensión. Por enseñarme la disciplina a través del ejemplo.

Al Doctor José Venegas González, por su experiencia, apoyo y orientación a lo largo de los estudios de maestría. Por enseñarme a ser humilde y respetuoso.

Al comité tutorial: Dra. Martha Elena Pedraza Santos, Dr. José Venegas González, Dra. Martha Alicia Velázquez Machuca, Dr. Gilberto Vázquez Gálvez, Dr. José Luis Montañez Soto.

A todos.... Gracias!!!



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Mich. siendo las 12:00 horas del día 18 del mes de marzo del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-MICH. para examinar la tesis titulada:

**“Organogénesis *in vitro* de Arándano *Vaccinium corymbosum L.*”**

Presentada por el alumno:

**VICTORIANO**  
Apellido paterno

**MORA**  
Apellido materno

**HUGO**  
Nombre(s)

Con registro: 

B	0	7	1	1	8	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. José Venegas González

Dra. Martha Elena Pedraza Santos

Dra. Martha Alicia Velázquez Machuca

Dr. José Luis Montañez Soto

Dr. Gilberto Vázquez Gálvez

Dr. Carlos Víctor Muñoz Ruiz  
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
Instituto Politécnico Nacional  
COMITÉ INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
CIIDIR - MICH.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Jiquilpan, Mich., el día 22 del mes marzo del año 2010, el (la) que suscribe Hugo Victoriano Mora alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable con número de registro B071186 adscrito al CIIDIR-Unidad Michoacán, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. José Venegas González y Dra. Martha Elena Pedraza Santos y cede los derechos del trabajo intitulado "Organogénesis in vitro de Arándano Vaccinium corymbosum L." al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: victorianomora@hotmail.com; jvenegasg@ipn.mx y marelpesa@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



HUGO VICTORIANO MORA

# ÍNDICE

	<b>Pag.</b>
ÍNDICE DE CUADROS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	2
HIPÓTESIS.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Descripción del arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L.....	3
2.2 Perspectivas del arándano.....	3
2.3 Requerimientos edafoclimáticos.....	6
2.4 Variedades.....	9
2.5 Propagación por estacas.....	10
2.6 Propagación <i>in vitro</i> .....	11
2.7 Propagación <i>in vitro</i> de arándano.....	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Localización del sitio experimental.....	18
3.2 Material vegetal.....	18
3.3 Establecimiento del cultivo aséptico.....	18
3.4 Posición del explante en el medio de cultivo.....	19
3.5 Inducción de brotes axilares.....	19
3.6 Efecto de los niveles de 2iP.....	21
3.7 Efecto del balance de citocininas y auxinas.....	22
3.8 Efecto de la concentración de fuente de carbono.....	22
3.9 Comparación de medio WPM y WPM modificado.....	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1 Establecimiento del cultivo aséptico.....	25
4.2 Posición del explante en el medio de cultivo.....	27
4.3 Inducción de brotes.....	29
4.4 Influencia del tipo de citocinina.....	30
4.5 Influencia de los niveles de 2iP.....	32
4.6 Efecto del balance de auxinas y citocininas en la generación de brotes de yemas axilares.....	33
4.7 Evaluación de la concentración de fuente de carbono.....	29
4.8 Comparación de los medios de cultivo WPM y WPM modificado.....	34
V. CONCLUSIONES.....	39
VI. BIBLIOGRAFIA.....	40
VII. APÉNDICE.....	45

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Influencia de la concentración de BA sobre la generación de brotes en explantes de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L.....	20
2	Efecto del tipo de citocinina sobre la inducción de brotes en explantes de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L.....	21
3	Efecto de los niveles de 2 isopentiladenina.....	21
4	Interacción citocinina 2iP y auxina ANA en el desarrollo <i>in vitro</i> de brotes de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L.....	22
5	Componentes del medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) y Woody Plant Medium Modificado (WPMM).....	23
6	Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio en la desinfección de explantes de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L.....	25
7	Influencia de la posición del explante en el medio de cultivo sobre el desarrollo de los brotes de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L.....	28
8	Efecto de las concentraciones de BA en la generación de brotes de los explantes.....	29
9	Efecto de diferentes hormonas en la generación de brotes.....	31
10	Efecto de las diferentes concentraciones de 2 isopentiladenina.....	32
11	Efecto del balance fitohormonal 2iP y ANA en la generación de brotes.....	34
12	Efecto de la concentración de fuente de carbono.....	36
13	Efecto de la comparación de los medios WPM y WPM modificado.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Metodología de reproducción <i>in vitro</i> de arándano.....	19
2	Regeneración in vitro de arándano.....	26
3	Brotes de arándano regenerados a partir de secciones de tallo con una yema axilar cultivados en el medio de cultivo con 2mg L <sup>-1</sup> de 2iP.....	31
4	Regeneración de callo organogénico a partir de secciones de tallo con una yema axilar de arándano.....	37

## RESUMEN

Para lograr establecer un protocolo de regeneración del arándano, se utilizaron plantas *Vaccinium corymbosum* L. de la variedad Biloxi cultivadas en campo y en invernadero. Los tejidos se sumergieron en una solución de Benlate y se sometieron a cinco concentraciones de hipoclorito de sodio comercial a 6% de i.a. Se cultivaron secciones de tallo con yema axilar en un medio WPM con tiamina, mio-inositol, sacarosa y agar. Para la inducción de brotes se efectuaron tres ensayos. En el primero los explantes se sometieron a diferentes concentraciones de Benciladenina. En el segundo ensayo, las yemas axilares se cultivaron con diferentes concentraciones de citocininas: BA, 2-isopentiladenina y Kinetina. En el tercer ensayo los explantes se cultivaron en medio WPM con diferentes concentraciones de 2iP. Para determinar si la regeneración de brotes de arándano requiere la adición de auxinas en combinación con citocininas, se subcultivaron yemas axilares en medio de cultivo WPM con 2iP combinados con cuatro niveles de la auxina ANA y un testigo sin fitohormonas. Para la determinación de la fuente de carbono se subcultivaron secciones de tallo con una yema axilar en medio de cultivo WPM con 2iP combinados con cinco tratamientos de sacarosa. Se compararon los medios WPM y WPM modificado. La menor contaminación (30 %) se obtuvo con hipoclorito de sodio a 30 % v/v. El número de brotes regenerados y el número de hojas expandidas por brote fue mayor (81 y 63 %, respectivamente) cuando los explantes se colocaron de forma horizontal comparado con la posición vertical. Con 1 ó 2 mg L<sup>-1</sup> de BA se obtuvo 45.46 % de brotación y con la concentración de 2 mg L<sup>-1</sup> de BA la longitud del brote fue mayor. La mejor citocinina fue 2iP con 2mg L<sup>-1</sup>. La concentración de 2mg L<sup>-1</sup> de 2iP con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA mostró brotes más largos (4 cm). La cantidad de 10 g L<sup>-1</sup> de sacarosa fue la óptima para el arándano así como el medio WPM modificado.

Palabras clave: *Vaccinium corymbosum* L, yemas axilares, citocininas, auxinas.

## ABSTRACT

To manage one to establish a protocol of regeneration of the cranberry, there were in use plants *Vaccinium corymbosum* L. of the variety Biloxi cultivated in field and in greenhouse. The tissues submerged in Benlate's solution and surrendered to five concentrations of hipoclorite of commercial sodium to 6 % of i.a. Sections of stem were cultivated by axilar buds in a way WPM with tiamine, mio-inositol, saccharose and agar. For the induction of outbreaks three tests were effected. In the first one the explantes surrendered to Bencildenine's different concentrations. In the second test, the axilar buds were cultivated by different concentrations of cytokinins: BA, 2-isopentiladenina and Kinetine. In the third test the explants were cultivated in way WPM by different concentrations of 2iP. To determine if the regeneration of outbreaks of blueberry needs the addition of auxins in combination with cytokinins, ANA and a witness subcultivated axilar buds in the medium of culture WPM with 2iP with four levels of the auxins without hormones. For the determination of the source of carbon sections of stem were subcultivated by a axilar buds in the medium of culture WPM with 2iP by five treatments of saccharose. The mediums WPM and modified WPM were compared. The minor pollution (30 %) was obtained with hipoclorite of sodium to 30 % v/v. The number of regenerated outbreaks and the number of leaves expanded to outbreak was major (81 and 63 %, respectively) when the explantes placed of horizontal form compared with the vertical position. With 1 ó 2 mg L<sup>-1</sup> of BA 45.46 % was obtained of proliferation and with the concentration of 2 mg L<sup>-1</sup> of BA the length of the outbreak was major. The best cytokinins was 2iP with 2mg L<sup>-1</sup>. The concentration of 2mg L<sup>-1</sup> of 2iP with or 5 mg L<sup>-1</sup> of ANA it showed longer outbreaks (4 cm). The quantity of 10 g L<sup>-1</sup> of saccharose was the ideal one for the cranberry as well as the way modified WPM.

Key words: *Vaccinium corymbosum* L, axilar buds, cytokinins, auxins.

## I. INTRODUCCIÓN

El arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) es una especie de la familia de las Ericáceas con gran demanda a nivel comercial por su bajo valor calórico y su alto contenido de antioxidantes, es una frutilla que actualmente está incursionando en nuevos e importantes mercados de Europa y Asia (Cobelo, 2004).

En Michoacán, el cultivo del arándano se estableció apenas hace cinco años en la región de Los Reyes, a partir de plantas adquiridas por empresas Chilenas propagadas por estacas. Este método de reproducción representa una desventaja porque la propagación es lenta, muy costosa y se generan pocas plantas a partir de una sola, además, en la práctica, la propagación por estacas tiene una serie de dificultades que se traducen en un bajo rendimiento o en la propagación de enfermedades indeseables para el cultivo.

El cultivo *in vitro* puede optimizar la obtención de clones de arándano resistentes a factores bióticos y abióticos, y de elevada producción, en grandes cantidades y en un tiempo menor. La micropropagación también permite obtener nuevas plántulas todo el año, independientemente del factor climático, además se pueden manejar cultivos libres de enfermedades y patógenos.

Existen informes sobre propagación *in vitro* de arándano en donde se logra la regeneración de brotes a partir de yemas axilares o secciones de hoja en un medio WPM con  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de 2-isopentil adenina (Yadong Li, 2006). Cabe destacar, que los genotipos reproducidos no son aptos para el cultivo en las condiciones climáticas de México y no existen estudios para la micropropagación de la variedad Biloxi considerada una de las mejores para el estado de Michoacán, por la calidad de sus frutos y porque sólo requiere de 400 horas frío, lo que le permite el desarrollo y producción en una amplia variedad de climas y terrenos (Fundación Jalisco, 2007).

## **Objetivo general**

Establecer un protocolo de propagación *in vitro* de arándano *Vaccinium corymbosum* L. variedad Biloxi.

## **Objetivos específicos**

- 1.** Determinar la concentración óptima para el establecimiento del cultivo aséptico.
- 2.** Evaluar la influencia de la posición y tipo de explante sobre la inducción de brotes adventicios.
- 3.** Determinar el efecto del medio, el balance de citocininas y auxinas y la concentración adecuada de la fuente de carbono sobre la inducción de brotes adventicios.

## **Hipótesis**

La propagación *in vitro* de arándano *Vaccinium corymbosum* L. vía organogénesis está determinada por el medio de cultivo, el tipo y posición del explante, el balance de auxinas y citocininas y la concentración de la fuente de carbono.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Descripción del arándano *Vaccinium corymbosum* L.

El arándano o mora azul (*Vaccinium corymbosum* L.) es un frutal menor nacido nativo de Norteamérica, que pertenece a la familia de las Ericáceas, subfamilia Vacciniaceae, subgénero *Cynacoccus* y es considerado dentro del grupo de las frutillas (Pritts y Hancock, 1992).

Se trata de un arbusto pequeño de 0.2 – 0.4 metros de altura, aunque existen variedades que llegan a medir 2.5 metros. Tanto los tallos como las hojas están cubiertas por un polvo blanquecino llamado pruina cenicienta, las hojas son persistentes, con espinas en el pecíolo y nervio medio, verde oscuro en el haz y blancuzco en el envés. Es un arbusto longevo, de hoja caduca y de madera leñosa. Las flores, miden de 2 – 3 cm de diámetro y son de color blanco o rosado. El fruto es una baya de forma larga y cónica, son al principio verdes, después rojas y al final se vuelven negros cuando se maduran. En la base de la planta se encuentra la corona, de donde se forman los tallos, la cual está conformada por una gran cantidad de raíces superficiales. El sistema radicular es profundo, puede llegar a profundizar más de un metro dependiendo del suelo y el subsuelo (Buzeta, 1997).

### 2.2 Perspectivas del arándano

En la actualidad se están produciendo algunos cambios a escala mundial en los hábitos de los consumidores de los países más desarrollados, lo cual genera una búsqueda de productos naturales diferenciados de mayor calidad y de grandes componentes nutritivos, tal es el caso de las frutas finas. Por frutas finas se entiende aquellas especies frutales que se identifican por su reducido tamaño, en comparación a las pomáceas (frutas de pepitas) o a las cítricas. Dentro de este grupo se incluyen al menos dos subgrupos reconocidos comúnmente por sus nombres en

inglés: los “berries” y los “cherries”, mientras que en castellano tienen nombres diversos como arándano, fresa, zarzamora, frambuesa, entre otros.

El Arándano ha tenido una rápida aceptación por parte de los consumidores de todo el mundo porque es pequeño, fácil de cocinar y de larga duración, estas cualidades además de su sabor único han sido los detonantes para la producción industrial. Esta frutilla es más bien propia de los norteamericanos, quienes han generado variedades y prácticas de cultivo para zonas específicas para reducir las enfermedades, los ataques de insectos y disminuir el stress de algunas plantas provocado por temperaturas extremas, inundaciones y heladas. Por esto, Estados Unidos es el principal productor – consumidor, exportador e importador de arándanos del mundo y junto a Canadá abarcan 90 % del área productiva total, seguida de Chile, Argentina, Nueva Zelanda, Australia y Sudáfrica.

Los principales productores europeos son: Francia, Holanda, Alemania, Polonia y España. Los países que más demandan este fruto son: Italia, Inglaterra, Bélgica y Holanda. Canadá es el principal proveedor de arándanos congelados del mundo, que a diferencia de EU, la producción canadiense es mayoritariamente de tipo silvestre. La demanda de arándanos en la Unión Europea ha crecido a un ritmo sostenido en los últimos años generando oportunidades de negocios interesantes para los productores. Además, existen posibilidades de apertura de nuevos mercados externos en algunos países de Asia, tales como China y Japón (Cobelo, 2004).

En el mundo, y en particular en Argentina, las frutas finas han constituido uno de los grupos más dinámicos del comercio alimentario de la última década. El valor exportado entre 1991 y 2001 se incrementó 60.17 % en cerezas, 52.03 % en arándanos (éstos entre 1994 y 2001), 34.34 % en frambuesas frescas, 13.85 % en frutillas frescas y 7.87 % en frutillas y frambuesas congeladas.

A pesar de haber sido la cereza el fruto que mayor porcentaje en materia de exportación ha obtenido en los últimos años, los análisis recientes muestran al arándano como el fruto con mejores perspectivas de crecimiento en Argentina. Esto se debe fundamentalmente a los altos precios que se consiguen en el mercado internacional por la llamada contra estación (Fabiani *et al* 2001), que ofrece una oportunidad de colocar el fruto en el período comprendido entre noviembre y abril, cuando se encuentran desabastecidos los mercados del Hemisferio Norte por hallarse en la estación invernal.

La mayor ventaja para los productores argentinos reside en el clima templado del centro del país, que implica un menor riesgo de heladas tardías, lo cual permite cosechar y ofrecer el fruto fresco en el mes de Noviembre donde se obtienen los mayores precios por la escasez de oferta mundial (Jones, 2004). Esta característica climática crea un nicho que comienza a ser aprovechado por los productores argentinos.

El cultivo del arándano fue introducido en Chile en la década de los ochenta y en este lustro se está introduciendo también en regiones importantes de México y en específico en Michoacán debido a que ha adquirido gran importancia por su alto valor nutritivo pero sobre todo por su gran rentabilidad; además, este Estado cuenta con una gran riqueza ambiental y provee de las características adecuadas para el desarrollo de la planta por lo que actualmente se cultiva a gran escala (Fundación Chile, 2000). Los agricultores del municipio de Los Reyes Michoacán adquieren la planta por medio de empresas Chilenas establecidas en dicha región, éstas reproducen la planta por medio de estacas porque no se conoce ninguna técnica de propagación *in vitro* para las variedades adaptadas a las condiciones de la región ni en el país.

En el mes de noviembre del 2007 la fundación Jalisco presentó un proyecto de desarrollo de la industria de las frutillas en el cuál resaltan que las condiciones climáticas, geográficas, logísticas le permitirán posicionarse en el mundo, en este proyecto se integran las actividades de

abastecimiento de la planta, la producción de frutillas, almacenamiento, comercialización y distribución del producto. Resulta un proyecto innovador, rentable y de alto impacto socioeconómico en donde se pretende cultivar 2,500 ha de arándano para generar aproximadamente 1,900 empleos fijos y 21,000 temporales directos y 65,000 empleos indirectos, número que representa 32 % de la población ocupada en el sector agropecuario; además, representaría una generación aproximada de 230 millones de dólares por concepto de exportaciones, lo que incrementaría el monto de las exportaciones del sector agroalimentario en 91.7 % teniendo como referencia las exportaciones registradas en el sector en el 2006. En términos de PIB, el proyecto aportaría anualmente alrededor de 647 millones de pesos, lo que representaría un incremento anual al PIB el sector del 2.5 % (Fundación Jalisco, 2007)

Una de las principales ventajas que tiene México para la exportación de esta frutilla, es la ubicación geográfica con respecto a los mercados de destino, lo que permite el abastecimiento en contra estación. Con respecto a lo anterior, en este cultivo se da una situación muy particular, ya que es un frutal muy arraigado a la tradición Norteamericana, lo que genera una demanda y precios muy particulares antes del 20 de Diciembre (Pritts y Hancock, 1992).

### **2.3 Requerimientos edafoclimáticos**

#### *Suelo*

La familia de las Ericáceas es considerada muy particular en sus requerimientos edafoclimáticos ya que prefieren los suelos ácidos con pH de 4 a 5, con abundante estructura de macroporos que permitan la aireación, buen drenaje, pero que tengan un adecuado abastecimiento de agua durante la temporada de crecimiento.

El suelo debe ser liviano, de textura limosa a franco arenosa y abundante materia orgánica, no toleran las arcillas pesadas que dificultan el crecimiento de raíces y que tienen un drenaje

imperfecto; tampoco los suelos calcáreos que les provocan severas deficiencias de fierro en los periodos de sequía. Para poder mantener vivo y en actividad este sistema radicular se necesita, imperativamente, recurrir al “mulch” y/o uso de materia orgánica en la cepa de plantación y sobre hilera, a fin de mejorar la estructura, retener humedad y aportar nutrientes para la planta. Además, con un alto contenido de materia orgánica existe una menor pérdida de nutrientes por lixiviación (Buzeta, 1997). Spiers *et al.*, (1985) mencionan que la preparación del suelo debe hacerse en forma total para mejorar su textura, el drenaje y además disminuir la incidencia de malezas.

El nitrógeno también puede ser retenido en la forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), que corresponde al ión que es absorbido por las raíces de los arándanos. Además, mantiene formas disponibles de elementos trazas como es el caso del fierro, un elemento particularmente requerido en estas especies de plantas.

El guano de vacuno y de gallina es excelente fuente de materia orgánica, en las zonas productoras de Michigan, EUA, se recomiendan aplicaciones anuales, en la primavera de 18 a 27 t ha<sup>-1</sup> de guano de vacuno o de 11 a 13 t ha<sup>-1</sup> de guano de gallina. Las distancias de siembra que se utilizan van desde 1.5 x 1.5 m hasta 3.0 x 3.0 m. con una densidad de 3000 a 5000 plantas ha<sup>-1</sup> (Buzeta, 1997).

### *Agua*

Este frutal tiene un requerimiento hídrico de tipo medio. Investigaciones indican que plantas de un año tienen un requerimiento óptimo de 3,300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> al año, equivalente al 60 % de la evaporación de bandeja. En plantas de dos años el requerimiento es de 4,000 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> al año, mientras que plantas de 3 y 4 años es de 4,300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> al año. Los estudios han definido varios periodos en que el agua es especialmente crítica para las plantas de arándano. Estos corresponden a las dos semanas posteriores a la caída de los pétalos; las dos semanas previas a la cosecha y las

dos a tres semanas posteriores a ésta. También cabe mencionar que durante el crecimiento de las bayas se produce una gran demanda de agua, pero en estrés hídrico durante el crecimiento de la fruta da origen a bayas pequeñas. En los riegos, es más importante la frecuencia que el tiempo de regadío (Buzeta, 2000).

### *Clima*

En condiciones naturales las especies de arándanos están distribuidas en variadas y disímiles condiciones climáticas en Norteamérica. Las plantaciones comerciales se ubican desde el Este de Canadá, con inviernos muy fríos y veranos cortos, en cuyas condiciones se cultiva el arándano bajo, hasta el Estado de Florida en el sur, donde se cultivan variedades de “Rabbiteye”.

El arándano alto crece comercialmente tanto en los veranos húmedos y calurosos de la costa Este (Nueva Jersey, Pensilvania, Carolina del Norte) como en los veranos secos y prolongados de la costa del Pacífico (Washington, Oregon).

Es un arbusto de hoja caduca que necesita de un periodo acumulado de horas frío (bajo 7.2 °C) durante el invierno, que le permita asegurar una floración pareja y abundante en primavera, sin caída de flores, las que se desarrollan en las yemas del ápice de la madera del año anterior. El arándano tiene un requerimiento del frío invernal de entre 650 – 850 horas bajo 7.2 °C, aunque difieren obviamente de acuerdo a la variedad y especie.

La formación de yemas florales es mayor a temperaturas alrededor de 24 °C. Las temperaturas cálidas mejoran la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico, mejoran el amarre de la fruta y aceleran su madurez. Sin embargo, temperaturas muy altas (32 °C) durante la madurez producen fruta de menor tamaño y de menor sabor.

Un factor de clima que no se debe olvidar es el viento, que produce daños severos, tanto por destrucción de follaje o ramas como por el daño de la roseta en la fruta, y por impedir el trabajo de las abejas en las especies que requieren de un agente polinizador como es el caso del arándano. Para este objeto, el uso de las cortinas cortavientos artificiales y/o naturales es realmente esencial. El lugar de plantación debe ser cuidadosamente seleccionado, tanto los árboles circundantes al huerto como los matorrales deben eliminarse a fin de permitir el drenaje del aire frío.

La temperatura ideal para el cultivo del arándano es de entre 12 y 18 °C, a una altitud de entre 1200 y 3500 msnm; la precipitación debe ser de entre 1500 – 2500 mm y con una humedad relativa de entre 80 y 90 %. Este fruto sufre bastante en época de heladas, causando quemazón grave en los tallos, hasta el punto que hay que cortarlos del todo y esperar la salida de nuevos brotes.

#### **2.4 Variedades**

Los arándanos son de tipo: Highbush y Rabbiteye. Los primeros se caracterizan por la producción de fruta de mejor calidad en cuanto a tamaño y sabor, las horas frío requeridas son menores a 400 y es de crecimiento rápido y vigoroso. Florece tarde por lo que se escapa a gran parte de las heladas invernales y soporta altas temperaturas. Este tipo representa 75 % de la producción cultivada en el mundo y alcanza 90 días de la floración a la madurez del fruto; los del tipo “Rabbiteye” son variedades consideradas de menor importancia económica aunque presentan una adaptabilidad mayor a condiciones adversas, pero su producción es más tardía, el periodo de desarrollo del fruto es de 120 días, tiene más problemas de polinización y no goza de las mismas cualidades organolépticas que el “highbush”.

Las variedades plantadas en países como Chile son mayoritariamente del tipo “Highbush” (“Bluecrop”, “Blueray”) y en las zonas más templadas se cultivan las variedades “Rabbiteye”, entre las más demandadas están la “O’Neal” y “Duke” (tempranas) y “Elliot” (tardía). En las zonas frías de EE.UU. existen más de 50 variedades del arándano “Highbush” la principal variedad es Bluecrop de producción intermedia y extensa, le siguen las variedades tempranas: Duke y Bluetta; las intermedias: Blueray y Weymouth ambas; y las tardías Jersey y Elliot. y más de 30 para el “Rabbiteye”.

En Los Reyes Michoacán, la variedad que se produce es la Biloxi, dicha variedad es la que se adapta mejor a las condiciones de la región. Otras variedades que están a prueba son la Sharpblue, Misty, O’Neal y “Duke” (Buzeta, 1997).

## **2.5 Propagación por estacas**

La propagación vegetativa se realiza a partir de estacas leñosas o estacas herbáceas con ramillas. Las estacas leñosas deben recolectarse justo antes de que comience la brotación en primavera; si se toman antes se deben almacenar en el rango de 4 a 7 °C dentro de las bolsas plásticas selladas y sin aire, hasta cumplir con su requisito de frío. Las estacas herbáceas con ramillas deben obtenerse el mes de noviembre antes de la inducción de las yemas y tener un grosor de entre 5 y 7 mm y una longitud aproximada de 12 cm con una constitución de tres a cinco yemas. Debido a la existencia de hojas este método de propagación debe contar con sistemas que eviten la deshidratación de las estacas. La propagación por estacas pareciera ser fácil, pero en la práctica tiene una serie de dificultades, que se traducen en un bajo rendimiento en el enraizamiento o en la propagación de enfermedades indeseables para el cultivo (Escalera, 2009).

## 2.6 Propagación *in vitro*

Los términos micropropagación, propagación *in vitro* y propagación por cultivo de tejidos son sinónimos que se usan para denominar un procedimiento que consiste en el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células o protoplastos en un medio de cultivo artificial para lograr el desarrollo y producción de plantas completas *in vitro* (Barba y Romero, 2001).

A grandes rasgos, la micropropagación implica la selección de una planta y el aislamiento de una parte de ella, llamada inóculo, el cual, después de someterse a una desinfección, se coloca en un medio de cultivo en donde dará origen a embriones o brotes y finalmente a plantas completas. Una vez que se obtienen las plantas, se colocan en condiciones *in vitro* y se trasplantan a un sustrato para adaptarlas a condiciones ambientales para su comercialización o utilización (Pierik, 1990).

Durante este procedimiento es necesario colocar el material vegetal libre de microorganismos en un ambiente que esté y pueda estar mantenido en condiciones estériles, y proveerlo tanto de sustancias químicas como de regímenes y condiciones de temperatura, presión, atmósfera e iluminación apropiados para el crecimiento y desarrollo de ese material.

La micropropagación puede iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta: órganos, tejidos o células. La elección dependerá de los objetivos que se persigan y de la especie que se vaya a propagar. Cuando se va a iniciar la micropropagación de una especie que ha sido poco investigada *in vitro*, es recomendable probar diferentes fuentes de inóculos (hoja, tallo, meristemas, semillas, flores) antes de decidirse por una de ellas (Barba y Romero., 2001).

Para la elección del inóculo es importante considerar la calidad de la planta madre, la edad fisiológica tanto de la planta madre como del inóculo, la época del año, el tipo y el tamaño del inóculo. Entre mejores sean las condiciones fitosanitarias y fisiológicas de la planta madre, mayor será la calidad y respuesta de los inóculos, lo que incrementa considerablemente las

probabilidades de lograr buenos resultados en la micropropagación; los inóculos obtenidos a partir de plantas cultivadas en invernadero bajo condiciones óptimas, son más fácilmente establecidos *in vitro* en comparación con el material proveniente de plantas desarrolladas en el campo (Pierik, 1990).

La época del año es importante, ya que determina el estado fisiológico en el que se encuentran la planta donadora y el inóculo al momento de la siembra. La micropropagación se obtiene satisfactoriamente a partir de inóculos tomados durante la etapa de crecimiento activo de la planta madre (por ejemplo en la primavera), aunque también puede lograrse a partir de inóculos plantas en estado de latencia.

La elección adecuada del tipo de inóculo, como semillas, hojas, brotes, meristemas, así como su tamaño, son determinantes para una micropropagación satisfactoria. El tipo de inóculo por utilizar dependerá de su potencial morfológico y de la ruta de la micropropagación: organogénesis o embriogénesis somática.

La organogénesis se refiere a la iniciación de órganos como tallo y raíces adventicias dentro de masas de células muy vacuoladas de callo y en gran parte parenquimatosas, las cuales pueden desarrollar meristemoides, que en condiciones específicas de cultivo inician órganos (Hartmann y Kester, 1998). La capacidad de regeneración de los tejidos está determinada por la interacción de factores intrínsecos (genotipo y estado de desarrollo) y extrínsecos (suministro de nutrientes orgánicos e inorgánicos, reguladores de crecimiento y condiciones físicas de incubación) de la planta, que en condiciones de cultivo *in vitro* pueden ser controlados (Caso, 1992).

La embriogénesis somática (asexual o adventicia), consiste en el desarrollo de embriones a partir de células que no son producto de una fusión gamética, es decir, en un proceso por el cual se produce una estructura bipolar (embrión) a partir de una célula somática (FAO, 1996)

Se pueden obtener embriones somáticos de muy diversas partes de la planta: ápices radiculares y caulinares, hipocótilos, peciolos, pedúnculos, hojas jóvenes y en general tejidos y órganos con características embrionarias, meristemáticas o reproductivas como embriones e inflorescencias inmaduras, trozos de escutelo, endospermo, óvulos o tejido ovárico (Pierik, 1990).

## **2.7 Propagación *in vitro* de arándano**

Uno de los informes para la iniciación *in vitro* de especies y cultivares de *Vaccinium* corresponde a Reed y Abdelnour (1991), quienes probaron el inicio de nuevos brotes bajo dos condiciones de crecimiento y cuatro tratamientos de citocininas. Pruebas iniciales con doce genotipos mostraron alta significancia 78 % de brotación de explantes sembrados en medio para plantas leñosas (WPM) con 4 mg L<sup>-1</sup> de zeatina, incubados a 25 °C en luz; con 10 ó 15 mg L<sup>-1</sup> de isopentiladenina (2iP) sólo se registraron 20 y 14 % de explantes con brotes, respectivamente.

Rowland y Ogden (1992) compararon medios de cultivo suplementados con citocinina conjugada con ribosa de zeatina (10, 20 ó 30 µM) contra medios suplementados con concentraciones óptimas de 2ip de 15 µM, para determinar su efectividad para la regeneración de brotes adventicios a partir de secciones de hojas de *Vaccinium corymbosum* L. El uso de 20 µM de ribosa de zeatina produjo la mayor cantidad de brotes (6) por sección de hoja, aproximadamente igual de alta a la producida en medio con 2ip. El número de brotes producidos en medio suplementado con zeatina no fue significativamente más alto que el número de brotes obtenido en medio con 2ip. Consecuentemente concluyeron que la citocinina conjugada con ribosa de zeatina fue más efectiva que cualquier otra de las citocininas libres, 2ip o zeatina, en la promoción de la regeneración de secciones de hojas del arándano.

Cao y Hammerschlag (2000) determinaron las condiciones óptimas para la organogénesis a partir de explantes de hojas del cultivar Bluecrop. El 98 % de los explantes regeneraron en promedio 11

brotos después de 62 días cuando los explantes se cultivaron pretrataron con 5  $\mu\text{M}$  de TDZ y 2.6  $\mu\text{M}$  de ANA por 4 días y con 7  $\mu\text{M}$  de ribosa de zeatina y 2.6  $\mu\text{M}$  de NAA por 3 días. El medio de regeneración contenía 1  $\mu\text{M}$  de TDZ por 6 semanas y por último, un medio sin reguladores de crecimiento por 10 días. La producción de brotes por explante en medios que contenían 1  $\mu\text{M}$  de TDZ fueron tres veces más grandes que los obtenidos en medios con 0.5  $\mu\text{M}$  de TDZ o 20  $\mu\text{M}$  de ribosa de zeatina, y nueve veces más de 5  $\mu\text{M}$  de TDZ. Estos mismos investigadores, en otro estudio encontraron que en explantes de los cultivares “Duke”, “Georgia Gem”, “Sierra” y “Jersey”, la adición de 1  $\mu\text{M}$  de TDZ al medio de cultivo es 100 % más efectivo que la incorporación de 0.5 ó 5  $\mu\text{M}$  de esta fitohormona (Cao y Hammerschlag, 2002).

En la micropropagación de “bilberry” y “lingonberry” se ha visto una fuerte influencia de las citocininas y la estación de crecimiento para la fase de iniciación de raíces en brotes micropropagados. Las concentraciones óptimas de 2ip para el inicio del crecimiento estuvieron entre 24 y 49  $\mu\text{M}$ . La primavera fue considerada como la mejor época para la iniciación de nuevos crecimientos en ambas especies. También, los tratamientos con 2.07  $\mu\text{M}$  de solución de sales potásicas de ácido indobutírico (KIBA) en brotes micropropagados antes de ser plantados mostraron beneficios durante el enraizamiento de ambas especies (Jaakola *et al.*, 2002).

Cao *et al* (2003) analizaron la influencia de los niveles de sacarosa en la proliferación de yemas axilares, indicaron que la propagación de brotes fue mayor, de 1.2 a 2.2 veces, cuando la concentración de sacarosa se incrementó de 15 mM a 44 mM. También indicaron que disminuyó cuando se aumentaron las dosis superiores a 44 mM.

Por su parte Ostrolucká *et al.* (2004) obtuvieron la generación de meristemas en especies de *Vaccinium* en un medio con 2  $\text{mgL}^{-1}$  de zeatina en comparación con 2iP, por lo que se concluyó que la zeatina es adecuada para la estimulación de la multiplicación de brotes de esta especie. Por

el contrario, Yadong Li *et al.* (2006) determinaron que el CPPU produce más hojas (41 hojas) después de 6 semanas que el uso de la zeatina (30 hojas) en las variedades “Sunrise” y “Georgia Gem”.

Otro método eficiente de propagación de brotes *in vitro* es mediante yemas axilares con el uso de 12.3 y 12.6  $\mu\text{M}$  de 2iP en un medio Zimmerman and Brome; los brotes que fueron enraizados en el mismo medio con 2iP presentaron una sobrevivencia de 99 % (Pereira, 2006).

Zhidong Zhang *et al* (2006) estudiaron la micropropagación de muchos genotipos de *Vaccinium* como el arándano “lowbush”, “half-high”, “Highbush”, “Rabbiteye”, “Cranberry” y “Lingonberry”. El sistema de micropropagación consistió en medio WPM con 0.1 – 2.0 mg de zeatina (o con 2iP), azúcar y agua corriente en vez de sacarosa y agua destilada para reducir costos. La iluminación fue de 2,000 – 10,000 lux en días de 12 – 16 horas con luz natural parcial. La temperatura se mantuvo de 25 – 30  $^{\circ}\text{C}$ . La transferencia de los brotes generados *in vitro* a un medio fresco se efectuó cada 40 días. El enraizamiento de los brotes *ex vitro* fue un método muy económico y efectivo para *Vaccinium*. Se alcanzaron buenos porcentajes de raíces con inmersión en 1000 – 2000  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido indolbutírico (AIB) o ácido naftalenacético (ANA) o empapar lentamente en 2, 5 y 10  $\text{mg L}^{-1}$  de IBA. El peat moss fue el medio más apropiado para aclimatar 90 % de los brotes *ex vitro* en invernadero; el túnel de plástico y arqueado de plástico más bajo con sombra se utilizó de manera exitosa para el enraizamiento de brotes *ex vitro*. Los brotes sobrevivieron y enraizaron bien después de 80 días de almacenamiento a 3 – 7  $^{\circ}\text{C}$  en oscuridad. No hubo diferencias significativas en brotes enraizados y crecimiento entre los tratamientos y el control. El medio de trasplante consistió en suelo de jardín y materia orgánica (peat, aserrín, paja en pedazos, etc.) mezclado 1:2 por volumen. El pH de la mezcla fue de 7, pero se le agregó 1 kg de sulfuro en polvo por metro cúbico. Las plantas crecieron en un vivero de 1.5 a 2 años. Hubo

muchos factores limitantes como el costo, el material para el medio y las técnicas, etc. Además, se concluyó que la variación somaclonal es aún un riesgo para la producción comercial.

Kaldmäe *et al.* (2006) por su parte determinaron que la propagación *in vitro* de *Vaccinium angustifolium* está determinada por las condiciones fisiológicas de la planta donadora de explantes. Los explantes se cosecharon en tres diferentes fechas: en febrero cuando las plantas en el campo están en dormancia, en mayo cuando el periodo de vegetación está cerca de empezar y en agosto después de que la fruta han sido cosechada. Los mejores resultados se obtuvieron con explantes colectados en mayo, porque la tasa de contaminación fue baja y 6 semanas después del cultivo, 98 % de los explantes sobrevivieron y 94 % tuvo desarrollo de brotes > 10mm. Los explantes colectados en febrero de plantas pretratadas tuvieron altas tasas de contaminación y muchas murieron durante las primeras semanas en cultivo. En todas las concentraciones de TDZ probadas (0.045, 0.91, 2.72 y 4.54  $\mu\text{M}$ ) la media promovió desarrollo de callos y brotes desarrollados permanecieron significativamente más cortos que los explantes cultivados con 4.56  $\mu\text{M}$  de zeatina. el incremento en peso fresco con TDZ fue el más alto con concentraciones de 0.91, 2.72 y 4.54  $\mu\text{M}$  pero la tasa de proliferación de brotes en todos los medios suplementados con TDZ permanecieron significativamente más bajos que el del testigo.

Meiners *et al.* (2007) analizaron el comportamiento de hormonas de crecimiento en un Woody Plant Media (Lloyd and McCown 1980), con 0.1 gL<sup>-1</sup> de myo-inositol, 3 % de sacarosa, 0.8 % de agar. Determinaron que en un medio suplementado con 18 $\mu\text{M}$  de zeatina, 51 % de los explantes establecidos originalmente desarrollaron brotes con hojas verdes y rojas, mientras que en un medio que contenía 9.1 $\mu\text{M}$  de zeatina y 25 $\mu\text{M}$  de 2-iP, 47 % de los segmentos nodales generaron brotes. Cerca de 53 % de los explantes en un medio suplementado con 25 $\mu\text{M}$  de 2-iP sobrevivieron y 40 % desarrollaron brotes con hojas rojizas y callos en las bases. Los brotes en un medio con 2-iP mostraron retraso en el crecimiento.

Debnath (2009) estudió el efecto de la concentración del TDZ y la polaridad del explante en brotes adventicios de explantes de hoja, determinó que el cultivo de hojas produce múltiples yemas y brotes con o sin una fase intermedia del callo cuando se incrementa de 2.3 – 4.5  $\mu\text{M}$  de TDZ y se evalúa a las 6 semanas del inicio del cultivo. La regeneración de brotes a partir de hojas fue de 59 a 61 % de segmentos de hojas jóvenes en posición basal con un lado adaxial tocando el medio de cultivo y mantenido por dos semanas en oscuridad. Transfirió los medios iniciados en un medio con TDZ a un medio que contenía 2.3 – 4.6  $\mu\text{M}$  de zeatina y produjo brotes utilizados después del subcultivo adicional. La cantidad de 4.5  $\mu\text{M}$  de TDZ tuvo una regeneración de callo de 78 %, el tamaño del callo fue de 6.8 cm y la regeneración de yemas fue de 61 %.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Localización del sitio experimental**

El trabajo se efectuó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo ubicada en la ciudad de Uruapan Michoacán.

#### **3.2 Material vegetal**

Se utilizaron plantas de arándano de la variedad Biloxi cultivadas en campo y en el invernadero de la Facultad. Esta variedad es ideal para la región de Los Reyes Michoacán.

#### **3.3 Establecimiento del cultivo aséptico**

Los tejidos se sumergieron durante 30 minutos en solución de Benlate a 0.2 % y se sometieron a cinco concentraciones de hipoclorito de sodio comercial a 6% de i.a. (20, 30, 40, y 50 % v/v), durante 20 minutos. En la campana de flujo laminar, las yemas se enjuagaron cinco veces con agua estéril hasta eliminar los residuos de hipoclorito de sodio, y se tomaron como explantes secciones de tallo de 1 cm de longitud con una yema axilar. Se colocaron seis explantes en cada frasco de vidrio de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) con tiamina ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), azúcar ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) y agar ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ), sin fitohormonas (figura 1); el pH se ajustó a 5.7. A los 10 días después de la siembra se registraron los porcentajes de contaminación por hongos y bacterias, de explantes necrosados y de explantes con brotes.

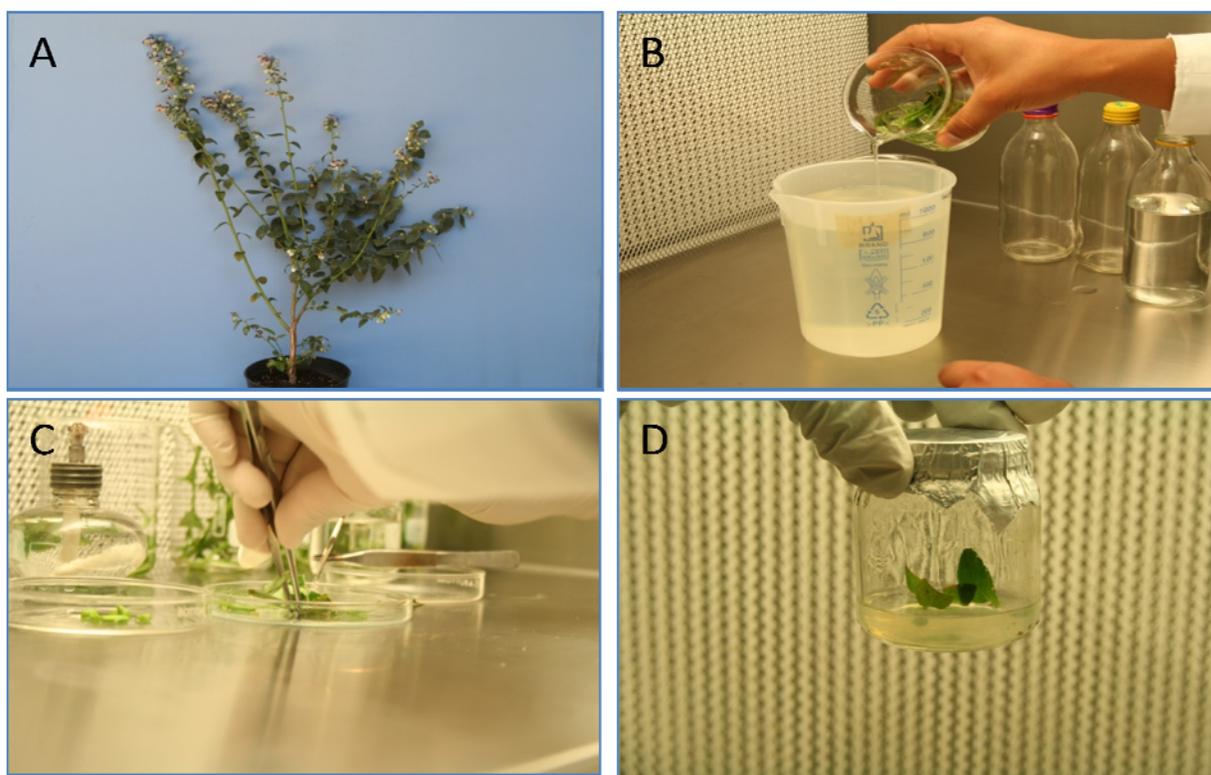


Figura 1. Metodología de reproducción *in vitro* de arándano *Vaccinium corymbosum* L. A) selección de la planta madre. B) Desinfección y enjuague de material genético. C) corte de yemas axilares. D) yemas axilares en el medio de cultivo.

### 3.4 Posición del explante en el medio de cultivo

Secciones de tallo con yema axilar se cultivaron en medio WPM con tiamina ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) y agar ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ). Se establecieron dos tratamientos (posición del explante) con diez repeticiones, la unidad experimental consistió en un frasco con cuatro yemas. A los 28 días se registraron las variables número de explantes con brotes, número de brotes por explante y número de hojas expandidas por explante.

### 3.5 Inducción de brotes axilares

Para la inducción de brotes se efectuaron tres ensayos. En el primero se colocaron tres secciones de tallo con yema axilar en frascos de vidrio de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio WPM

con 0.4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 6 g L<sup>-1</sup> de agar. Los explantes se sometieron a cinco tratamientos conformados por diferentes concentraciones de BA (0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg L<sup>-1</sup>) (Cuadro 1), cada uno con cinco repeticiones.

**Cuadro 1. Influencia de la concentración de Benciladenina (BA) sobre la generación de brotes en explantes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)**

Tratamiento (Núm.)	Cantidad de BA (mg L <sup>-1</sup> )
1	0
2	0.5
3	1
4	2
5	3

En el segundo ensayo, las yemas axilares de arándano se cultivaron en medio WPM con diferentes concentraciones de citocininas: BA (0, 1 y 2 mg L<sup>-1</sup>); 2iP (0, 1 y 2 mg L<sup>-1</sup>) y Kinetina (0, 1 y 2 mg L<sup>-1</sup>)(Cuadro 2). Se establecieron cinco repeticiones, cada una conformada con cuatro explantes por frasco de cultivo de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio de cultivo similar al descrito anteriormente.

**Cuadro 2. Efecto del tipo de citocinina sobre la inducción de brotes en explantes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)**

Tratamiento (Núm.)	BA (mg L <sup>-1</sup> )	2 iP (mg L <sup>-1</sup> )	Kinetina (mg L <sup>-1</sup> )
1	0		
2	1		
3	2		
4		1	
5		2	
6			1
7			2

### 3.6 Efecto de los niveles de 2 isopentiladenina

En el tercer ensayo los explantes se cultivaron en medio WPM similar al descrito en el ensayo anterior con diferentes concentraciones de 2iP (0, 2, 3, 4 y 5 mg L<sup>-1</sup>) (cuadro 3), se colocaron cuatro yemas en cada frasco de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio de cultivo.

**Cuadro 3. Niveles de 2 isopentil adenina**

Tratamiento	2iP
1	0
2	2
3	3
4	4
5	5

En los tres ensayos se tomaron datos del número de explantes con brote, longitud, número de hojas expandidas, vigor y color del brote, a los 28 días después del establecimiento de los cultivos. Para el registro de las variables vigor y color del brote, se consideró una escala arbitraria del 1 al 3 en donde 1 fue verde intenso, 2 verde pálido y 3 café o necrosado.

### 3.7 Efecto del balance de citocininas y auxinas

Para determinar si la regeneración de brotes de arándano requiere la adición de auxinas en combinación con citocininas, se subcultivaron yemas axilares en medio de cultivo WPM con 2 mg L<sup>-1</sup> 2iP combinados con cuatro niveles de la auxina ANA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg L<sup>-1</sup>) y un testigo sin fitohormonas (Cuadro 4). Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento, distribuidos de acuerdo con un diseño estadístico completamente al azar; la unidad experimental consistió en un frasco con cuatro explantes. A los 28 días se tomaron datos del número de explantes con brote, longitud de brotes, número de hojas expandidas, vigor y color de los brotes obtenidos.

**Cuadro 4. Interacción citocinina (2iP) y auxina (ANA) en el desarrollo in vitro de brotes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)**

Tratamiento (número)	2 iP(mg L <sup>-1</sup> )	ANA(mg L <sup>-1</sup> )
1	0	0
2	2	0
3	2	0.5
4	2	1
5	2	2

Los datos de las variables registradas se sometieron a un análisis de varianza y prueba de Tukey para la comparación de medias entre tratamientos con el uso del programa estadístico SAS versión 6.12.

### 3.8 Efecto de la concentración de la fuente de carbono

Se subcultivaron secciones de tallo con una yema axilar en medio de cultivo WPM con 2 mg L<sup>-1</sup> 2iP combinados con cinco tratamientos de sacarosa (10, 20, 30, 40 y 50 g L<sup>-1</sup>). Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento, la unidad experimental consistió en un frasco con cuatro

brotos. A los 28 días se evaluaron las variables diámetro del callo, peso, apariencia y porcentaje de necrosis.

Los datos de las variables registradas se sometieron a un análisis de varianza y prueba de Tukey para la comparación de medias entre tratamientos con el uso del programa estadístico SAS versión 6.12.

### 3.9 Comparación del medio WPM y WPM modificado

Se cultivaron yemas axilares en medio de cultivo WPM y WPM modificado con 2 mg L<sup>-1</sup> 2iP, 0.4 mgL<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg de mioinositol, 10 g L<sup>-1</sup> de azúcar y 6 g L<sup>-1</sup> de agar. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento, la unidad experimental consistió en un frasco con cuatro explantes. A los 28 días se evaluaron las variables: número de explantes que produjeron callo, el lugar en el que se produjo el callo (hojas o extremos) y el número de masas con callo.

**Cuadro 5. Componentes del medio Woody Plant Medium (WPM) y Woody Plant Medium Modificado (WPMM)**

WPM		WPMM	
Nitrato de amonio (mg L <sup>-1</sup> )	400	Nitrato de amonio (mg L <sup>-1</sup> )	400
Sulfato de magnesio(mg L <sup>-1</sup> )	370	Sulfato de magnesio(mg L <sup>-1</sup> )	370
Cloruro de calcio(mg L <sup>-1</sup> )	96	Fosfato de potasio (mg L <sup>-1</sup> )	170
Fosfato de potasio (mg L <sup>-1</sup> )	170	Nitrato de calcio(mg L <sup>-1</sup> )	684
Nitrato de calcio(mg L <sup>-1</sup> )	556	Nitrato de potasio(mg L <sup>-1</sup> )	190
ANA(mg L <sup>-1</sup> )	0.5	EDTA(mg L <sup>-1</sup> )	73.4
2iP(mg L <sup>-1</sup> )	2	ANA(mg L <sup>-1</sup> )	0.5
Tiamina (mg L <sup>-1</sup> )	0.4	2iP(mg L <sup>-1</sup> )	2
Inositol (mg L <sup>-1</sup> )	100	Tiamina(mg L <sup>-1</sup> )	0.4
Agar (g L <sup>-1</sup> )	6	Inositol (mg L <sup>-1</sup> )	100
Azúcar (g L <sup>-1</sup> )	10	Agar (g L <sup>-1</sup> )	6
		Azúcar (g L <sup>-1</sup> )	10

En todos los ensayos los cultivos se almacenaron en el cuarto de incubación a 25 °C en un fotoperiodo de 16 horas con luz blanca fría fluorescente de 75 W y una radiación fotosintéticamente activa de 45  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Los datos de las variables de los ensayos mencionados se sometieron a análisis de varianza y prueba de comprobación de medias entre tratamientos (Tukey 0.05) con el paquete estadístico SAS Versión 9.0.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Establecimiento del cultivo aséptico

La menor contaminación (30 %) se obtuvo con hipoclorito de sodio a 30 % v/v, a los 28 días en 90 % de estos explantes se obtuvo un brote que provino del desarrollo de la yema axilar (Figura 2A). Con 50 % de hipoclorito de sodio, los explantes sufrieron daños por necrosis y algunas quemaduras por lo que solo 20 % de estos desarrollaron un brote axilar (Cuadro 6, Figura 2B) La contaminación se generó principalmente por hongos en 90 %, con micelio aéreo color grisáceo claro algodonoso presente en la superficie del medio de cultivo (Figura 2C).

**Cuadro 6. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio en la desinfección de explantes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)**

Concentración de NaClO 6%	Explantes contaminados	Explantes con respuesta
I.A (% v/v)	(%)	(%)
20	80	70
30	20	90
40	30	50
50	30	20



Figura 2. Regeneración *in vitro* de arándano. A) yema axilar en brotación. B) explante con necrosis. C) explante contaminado.

Nuestros resultados obtenidos muestran que no se requieren grandes cantidades de hipoclorito de sodio (30 % v/v) para desinfectar los explantes de arándano, similar a lo informado por Debnath *et al* (2008) quien obtuvo 75 a 85 % de explantes asépticos de arándano lowbush (*Vaccinium angustifolium* Ait) cuando utilizó hipoclorito de sodio 0.79 % (15 % cloro comercial) y sólo cuantificó de 5 a 10 % de explantes contaminados. Por el contrario Meiners *et al.* (2007) quienes utilizaron concentraciones 3 % de i.a. de este compuesto durante 10 minutos en arándano variedad “Ozarkblue”. Kaldmä *et al* (2006) mencionan que con 3 % de hipoclorito de sodio (50 % v/v) obtuvieron 98 % de sobrevivencia en explantes de *Vaccinium angustifolium* colectados en el mes de mayo, aunque estos autores mencionan que la contaminación depende de la época de colecta, debido a que los explantes colectados en febrero presentaron 42 % de explantes libres de agentes fitopatógenos.

El oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot *et al.* 1996; Bray *et al.* 2000). Este fenómeno ocurre principalmente en especies leñosas como el arándano y constituye uno de los problemas más serios y frecuentes en el

establecimiento del cultivo *in vitro*; el problema tiende a disminuir cuando inicia el crecimiento del explante. La disminución de este problema en arándano podría evitarse con el uso de medio líquido, cambio del agente gelificante, uso de carbón activado o la sustitución del regulador del crecimiento, como sugiere Azofeifa (2009) que ocurre en otras especies.

#### **4.2 Posición del explante en el medio de cultivo**

Los tejidos mostraron una marcada polaridad en la respuesta morfogénica. El número de brotes regenerados y el número de hojas expandidas por brote fue mayor (81 y 63 %, respectivamente) cuando los explantes se colocaron de forma horizontal comparado con la posición vertical (Cuadro 7); esta respuesta posiblemente se debió a que en la posición horizontal el explante presentó mayor superficie de contacto con el medio de cultivo y con la hormona BA contenida en el mismo.

Se ha demostrado que la orientación del explante es un factor importante que aumenta la respuesta morfogénica en explantes de hoja de arándanos (Debnath y McRae 2002; Debnath 2005a). En los experimentos de Meiners *et al* (2007), el porcentaje de regeneración fue alto cuando las hojas de arándano rojo (Red pearl) y arándano azul (Ozarkblue) se colocaron en el medio en posición adaxial, pero no se encontró diferencia significativa en hojas en posición abaxial.

**Cuadro 7. Influencia de la posición del explante en el medio de cultivo sobre el desarrollo de brotes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)**

Posición del explante	Número de yemas axilares	Número de brotes por explante	Número de hojas expandidas
Horizontal	40	27	55
Vertical	40	5	20

La polaridad de regeneración varía con el genotipo y puede ser revertida por los tratamientos de reguladores de crecimiento (George 1993) y puede estar relacionado con la posición del órgano o la pieza del tejido de la planta intacta. En secciones de hoja de arándano (*Vaccinium angustifolium* Ait) se tuvo mayor capacidad de regeneración de brotes en segmentos medios y basales que en segmentos apicales. El tamaño del callo y el vigor del brote no se afectaron por la polaridad de la hoja. En arándano lowbush la capacidad de regeneración de brotes adventicios fue mayor en el segmento basal que en el segmento apical. Esto podría ser porque la región basal de la hoja contiene más células meristemáticas que la región distal (Debnath, 2009).

En la multiplicación vegetativa de arándano a través de estacas, también se ha informado que este proceso está influenciado por el fenómeno de topófisis, fenómeno por el cual diferentes puntos de crecimiento generan diferencias en la capacidad de regeneración de brotes o raíces. En el trabajo de Escalera (2009), sobre propagación vegetativa de arándano a partir de estacas, se encontró que los valores más altos de enraizamiento fue en estacas de tipo basal con 64 % de respuesta, mientras que para las estacas en la posición intermedia en el tallo se obtuvo un valor de 61 % de enraizamiento, para el caso de las estacas terminales su respuesta de enraizamiento fue de 40 % formando un segundo grupo de significancia.

### 4.3 Inducción de brotes

Los resultados obtenidos muestran que se requiere de 1 ó 2 mg L<sup>-1</sup> de BA para obtener 45.46 % de brotación. Con la concentración de 2 mg L<sup>-1</sup> de BA la longitud del brote fue mayor, pero en la medida que se aumentaron las concentraciones, la longitud disminuyó significativamente, lo que nos indica que un exceso de citocininas en el medio puede inhibir la formación de brotes, como ocurre en el arándano (*Vaccinium macrocarpon* Ait) en donde los niveles excesivos de zeatina puede inhibir la proliferación de brotes y la formación de raíces, quizás por los altos niveles de citocininas en los tejidos (Debnath,2008) (cuadro 8).

**Cuadro 8. Efecto de la concentración de benciladenina (BA) en la regeneración in vitro de brotes de *Vaccinium corymbosum***

BA mg L <sup>-1</sup>	Explantes con brotes (%)	Longitud (cm)
0	0	0 b
0.5	25.60 a	0.75 a
1	45.46 a	0.58 ab
2	45.46 a	0.80 a
3	11.27 ab	0.16 ab

Medias en la columna con la misma letra indican promedios iguales estadísticamente (Tukey, 0.05).

El porcentaje de explantes con respuesta registrado en esta investigación fue inferior al obtenido por Echer y Noé (1989) en arándano *Vaccinium corymbosum* L. quienes lograron de 63 a 69 % de segmentos nodales con brotes en medio con 2iP, aunque estos brotes fueron pequeños y de crecimiento retardado debido a que las concentraciones altas de 2iP se muestra fitotoxicidad en los tejidos.

Pierik (1990) menciona que la citocinina BA es la más eficaz a la hora de inducir la formación de vástagos adventicios y en algunas ocasiones se producen raíces adventicias. Estudios de Olivera *et al.* (2000) en el cultivo *in vitro* de Gerbera (*Gerbera Jamesonii* H. Bolus) mencionan que la formación de brotes se logró al utilizar 8.8  $\mu\text{M}$  de BA lo que resulta en promedio 5.4 brotes por explante. Similares resultados obtuvieron (Severín, 2008) quienes indicaron que con la concentración de 1  $\text{mg L}^{-1}$  de BA se manifiesta un aumento en la longitud de la yema axilar de *Achirocline satureioides* de 5 mm en 9 días.

Sin embargo, para la regeneración *in vitro* de brotes adventicios en diversos cultivares de arándano, no se tienen informes sobre el uso de BA; en cambio, se han utilizado las citocininas 2iP (Reed y Abdelnour, 1991; Rowland y Ogden, 1992; Jaakola *et al.*, 2002; Ostrolucki *et al.*, 2004; Zhidong Zhang *et al.*, 2006), zeatina (Ostrolucká *et al.*, 2004) y TDZ (Cao y Hammerschlag, 2000). Por lo anterior, en la presente investigación fue necesario implementar nuevos ensayos con estas citocininas.

#### **4.4 Influencia del tipo de citocinina**

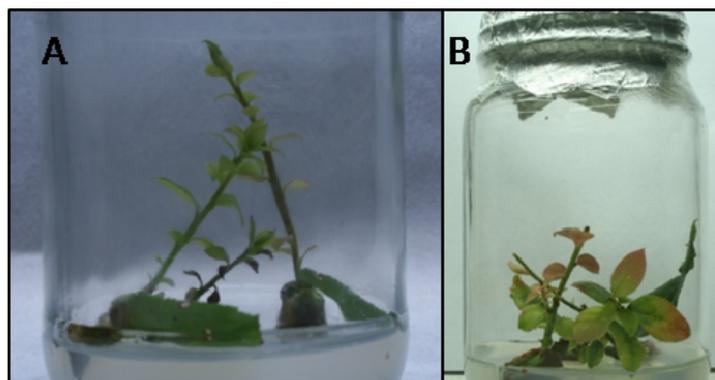
La kinetina no influyó sobre la inducción de brotes, los explantes en donde se adicionó esta fitohormona tuvieron brotes estadísticamente similares a los del tratamiento testigo en longitud, número de hojas expandidas, vigor y color; además el número de explantes con brotes fue superior en el tratamiento sin fitohormonas que con cualquiera de las dos concentraciones de kinetina (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Efecto de diferentes hormonas en la generación de brotes**

Citocinina (mg L <sup>-1</sup> )	Explantos con brotes (%)	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas expandidas	Vigor del brote	Color del brote
0	52 bc	2.0 bc	1.2 bc	1.2 b	1.6 b
BA	1.0	60 b	2.4 bc	1.2 b	1.6 b
	2.0	72 ab	1.6 c	1.6 b	1.4 b
2iP	1.0	72 ab	3.6 ab	1.6 b	1.4 b
	2.0	88 a	4.6 a	2.6 a	2.6 a
Kin	1.0	32 c	1.2 c	1.2 b	1.2 b
	2.0	32 c	1.6 c	1.0 b	1.0 b

Medias en la columna con la misma letra indican promedios iguales estadísticamente (Tukey, 0.05).

La adición de 2 mg L<sup>-1</sup> de 2iP incrementó la capacidad de regenerar brotes, que fueron más largos, presentaron mayor número de hojas expandidas y mostraron mejor color y vigor que el resto de los brotes regenerados con los otros dos tipos de citocininas (BA y Kin) (Figura 3). Esta influencia significativa y positiva del 2iP también ha sido observada por Ostrolucká *et al.* (2004) quienes mencionan que obtuvieron 33 % de explantes con brotes cuando aplicaron 2.5 mg L<sup>-1</sup> de esta fitohormona.



**Figura 3.** Brotes de arándano regenerados a partir de secciones de tallo con una yema axilar cultivados en medio WPM con 2 mg L<sup>-1</sup> de 2iP. A) Brotes alargados; B) Brotes vigorosos con hojas expandidas.

Las necesidades de citocininas son extremadamente variables y dependen del contenido endógeno de la especie (Pierik, 1990). De las citocininas comúnmente aplicadas (BA, kinetina, 2iP y zeatina), la BA es la más activa, la más económica y la más utilizada en especies leñosas (Domínguez *et al*, 2008). Sin embargo, el elevado nivel de reguladores del crecimiento endógeno que parecen mostrar los tejidos de arándano, permiten a los explantes producir brotes óptimamente con bajas concentraciones de citocininas (Debnath, 2009), o citocininas menos activas como 2iP y zeatina; y la adición de BA parece mostrar un efecto tóxico sobre los tejidos.

#### 4.5 Influencia de los niveles de 2iP

Los resultados indican que la concentración de 2iP no influyó sobre la longitud, el número de hojas expandidas y el vigor del brote; en cambio, la incorporación de 2 mg L<sup>-1</sup> de esta fitohormona en el medio de cultivo incrementó el color verde intenso en los tejidos.

**Cuadro 10. Efecto de las diferentes concentraciones de 2iP**

2iP mg L <sup>-1</sup>	Longitud cm	Número de hojas expandidas	Vigor del brote	Color del brote
0	1.2 a	4.8 a	2.2 a	2.2 ab
2	1.2 a	4.6 a	2.6 a	2.8 a
3	1.1 a	4.2 a	2.2 a	2.0 ab
4	0.7 a	3.4 a	1.6 a	1.2 b
5	1.0 a	3.8 a	2.4 a	2.0 ab

Medias en la columna con la misma letra indican promedios iguales estadísticamente (Tukey, 0.05)

Los brotes regenerados fueron pequeños (1.04 cm en promedio) en contraste con los obtenidos por Debnath (2009) de 5 a 6 cm de longitud en promedio; aunque fueron más largos que los obtenidos en los clones de arándano “QB1”, “QB2” y “PB1”, de apenas 5-7 mm. Esta inhibición de la elongación del brote se puede deber a la alta actividad de la citocinina TDZ utilizada a una concentración de 2.3  $\mu\text{M}$  (Huetteman y Preece 1993). El retardo en el crecimiento de los brotes de arándano también ha sido observado por Dwikat y Lyrene (1988) quienes reportaron inhibición de elongación del brote por efecto del 2iP. Meiners *et al* (2007) indicaron que con 25  $\mu\text{M}$  de 2iP hubo respuesta de formación de brotes en segmentos nodales en 63 y 69 % de los brotes, pero éstos fueron muy pequeños, mostraron crecimiento atrofiado y sin desarrollo. Eccher y Noé (1989) mencionan que altas dosis de 2iP pueden ser fitotóxicos en cultivos de *Vaccinium corymbosum* L.

#### **4.6 Efecto del balance de citocininas y auxinas en la generación de brotes de yemas axilares**

La regeneración de brotes no estuvo influenciada por las fitohormonas adicionadas, ya que incluso en el tratamiento testigo se tuvo en promedio 83 % de explantes con brotes, estadísticamente similar al resto de los tratamientos (Cuadro 11). Estos resultados sugieren que el umbral del nivel de los reguladores del crecimiento endógeno acumulados en los explantes de arándano permiten a éstos producir brotes óptimamente en ausencia de fitohormonas exógenas (Debnath, 2009).

**Cuadro 11. Efecto del balance fitohormonal 2iP y ANA en la generación de brotes**

2iP (mg L <sup>-1</sup> )	ANA (mg L <sup>-1</sup> )	Explantes con brote (%)	Longitud (cm)	Hojas expandidas por explante	Vigor del brote	Color del brote
0	0	90 a	2.9 d	9.3 b	1.5 c	1.5 c
2	0	80 a	3.6 b	13.0 a	3.0 a	3.0 a
2	0.5	85 a	4.0 a	13.0 a	2.0 b	3.0 a
2	1.0	80 a	3.0 c	6.0 d	2.0 b	2.0 b
2	2.0	80 a	2.7 e	8.0 c	1.0 d	1.0 d

Medias en la columna con la misma letra indican promedios iguales estadísticamente (Tukey, 0.05)

Los brotes obtenidos fueron más largos (4 cm) con 2 mg L<sup>-1</sup> de 2iP más 0.5 mg L<sup>-1</sup>, pero a medida que se aumentó la auxina a 1 ó 2 mg L<sup>-1</sup> disminuyó la longitud en 25 y 11 % respectivamente. El número de hojas expandidas por brote fue similar estadísticamente cuando se adicionó 2 mg L<sup>-1</sup> de 2iP sólo o en combinación con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, aunque el vigor del brote fue superior en ausencia de auxina. El color de los brotes fue verde más intenso en los tratamientos en donde no se aplicó ANA o este se incluyó en baja concentración (0.5 mg L<sup>-1</sup>) (Cuadro 11).

Nuestros resultados sugieren que no es necesario la inclusión de auxinas en el medio de cultivo para la regeneración de brotes *in vitro* de arándano, contrario a lo que mencionan Barceló *et al.* (1995) quienes indican que la inducción de una respuesta morfogénica en los explantes requiere de un balance entre auxinas y citocininas.

Informes sobre efectos de ANA en combinación con citocininas en arándano suelen ser contradictorios, Marcotrigiano *et al.* (1996) describen un medio de cultivo con 1µM de TDZ y 1 µM de ANA como la combinación más recomendable para la inducción de brotes; sin embargo,

Qu *et al.* (2000) señalan el efecto negativo del ANA a pequeñas concentraciones (0.1 $\mu$ M). Meiners *et al.* (2007) en arándano rojo y azul, indican que la adición de 1 $\mu$ M de ANA incrementó el número de explantes con brotes, pero redujo el número de brotes individuales por explante; por lo tanto el medio con 20 $\mu$ M de zeatina sin ANA fue preferible.

Además, las excesivas concentraciones de auxinas y citocininas en el medio pueden causar plantas deformes (George 1996) e inducir variación somaclonal en las plantas regeneradas *in vitro* (Marcotrigiano and McGlew 1991). Un protocolo de regeneración de arándano sin auxinas en el medio de cultivo, reduce los costos y el tiempo para producir plantas.

#### **4.7 Evaluación de la concentración de la fuente de carbono**

La fuente de carbono mejoró la capacidad callogénica de los explantes, efecto que se observó principalmente en la zona basal del tallo y en secciones de hoja en contacto con el medio de cultivo (Figura 4A y 4B). Las masas de callo más grande (7.4 mm de diámetro) se obtuvieron con 40 y 50 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. El peso de materia fresca no se modificó por la concentración de la fuente de carbono; sin embargo, se observaron diferencias numéricas entre tratamientos, el mayor peso (785 mg) se logró al utilizar 20 g L<sup>-1</sup> pero al incrementar la concentración a 30 g L<sup>-1</sup> se registró una reducción en los valores de esta variable (Cuadro 12).

El callo se caracterizó por ser de color amarillo claro y poco friable (Figura 4), por lo que se consideró como tipo organogénico, con potencial para regenerar brotes en un subcultivo posterior y con un nuevo balance de fitohormonas. La apariencia del callo (color claro, sin necrosis y en crecimiento activo) fue mejor con 10 g L<sup>-1</sup>; en la medida que se incrementó la dosis disminuyó la calidad del mismo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Draper y Ogden (1993) quienes demostraron que se requiere de 5 g L<sup>-1</sup> de sacarosa para regenerar *in vitro* brotes de

arándano vigorosos y de color verde intenso; concentraciones mayores de esta fuente de carbono exhiben clorosis foliar y son difíciles de aclimatar a condiciones de invernadero.

**Cuadro 12. Efecto de la concentración de fuente de carbono sobre la regeneración de brotes en explantes de *Vaccinium corymbosum* L.**

Sacarosa (g L <sup>-1</sup> )	Diámetro del callo (mm)	Peso de materia fresca (mg)	Apariencia del callo <sup>†</sup>	Necrosis %
10	6.4 ab	619 a	3.0 a	43.8 bc
20	7.0 ab	785 a	1.8 ab	80.0 a
30	5.2b	475 a	2.0 ab	93.8 a
40	7.4 a	526 a	1.6 b	30.0 c
50	7.4 a	522 a	1.4 b	65.0 ab

Medias en la columna con la misma letra indican promedios iguales estadísticamente (Tukey, 0.05). <sup>†</sup>1 = mala; 2 = regular; 3 = buena

Una gran cantidad de los callos regenerados (80 y 93.75 %) presentaron necrosis cuando se aplicaron 20 ó 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, respectivamente; porcentaje que disminuyó considerablemente al aumentar a 40 g L<sup>-1</sup> de la fuente de carbono (30 % de callos necrosados).

Esta necrosis puede estar relacionada con la capacidad de absorción de agua de los tejidos, debido a que cuando se incrementa la cantidad de solutos disminuye el flujo del agua del medio de cultivo hacia los explantes. La sacarosa es la principal fuente de carbono para el desarrollo de los cultivos *in vitro*, pero es una sustancia que sirve como regulador osmótico. Por esto, se ha demostrado que la sacarosa regula la morfogénesis de los explantes, como sucede con la formación de yemas axilares en *Solanum tuberosum* L. (Vinterhalter *et al.*, 1997).



**Figura 4.** Regeneración de callo organogénico a partir de secciones de tallo con una yema axilar de arándano *Vaccinium corymbosum* L. A). Callo en la base del explante; B) y C) Callo organogénico en la superficie adaxial y abaxial de la hoja, en contacto con el medio de cultivo.

Cao *et al.* (2003) obtuvieron resultados similares al aplicar  $10 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa en explantes de arándano; estos autores concluyeron que con esta cantidad se promueve la proliferación de yemas axilares sin interferir en el transporte de genes; otros autores mencionan que los niveles de sacarosa adecuados para el cultivo *in vitro* del arándano están por debajo de los  $15 \text{ g L}^{-1}$  (Rowland and Ogden, 1992; Cao *et al.*, 1998, 2002; Cao and Hammerschlag, 2000). Por su parte Debnath (2004) concluye que la concentración óptima de carbohidratos para cultivo *in vitro* de arándano se encuentra entre  $10$  y  $20 \text{ g L}^{-1}$ , datos similares a los de la presente investigación. Menciona además, que la concentración más baja de sacarosa puede estimular la proliferación de yemas axilares en arándano lowbush.

#### **4.8 Comparación del medio WPM y WPM modificado**

Con el medio Woody Plant Medium Modificado (WPMM), casi la totalidad de los explantes (95 %) produjeron callo y éste fue más de dos veces que el producido en explantes cultivados en medio WPM (Cuadro 13). Similar al experimento anterior, la regeneración de callo se observó principalmente en los extremos del tallo y en las partes de la hoja en contacto con el medio de cultivo.

**Cuadro 13. Efecto de la comparación de los medios Woody Plant Medium (WPM) y Woody Plant Medium Modificado (WPMM)**

Medio de cultivo	Explantos con callo (%)	Tallos con callo en los extremos	Hojas con callo	Masas de callo por explante
WPM	50 b	0.2b	1.8b	2b
WPMM	95 a	3.8a	3.2a	7a

Medias en la columna con la misma letra indican promedios iguales estadísticamente (Tukey, 0.05).

La modificación del medio WPM consiste en una reducción de la cantidad total de sales minerales del medio original, componentes que pueden ser tóxicos para los tejidos de *Vaccinium corymbosum*, sobre todo por la poca tolerancia que presentan las plantas a los suelos salinos durante su cultivo en campo (Li *et al* 2004).

Villegas y Parada (2009) señalan que con el WPM modificado 43.4 % de los explantes cultivados del híbrido almendro x durazno H1 producen en promedio más brotes (20.4), de mayor longitud (13.7 mm) y sin problemas de hiperhidratación, que los cultivados en medio WPM normal.

## V. CONCLUSIONES

De acuerdo con la metodología utilizada al abordar los objetivos e hipótesis planteados para esta investigación y con base en los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

1. La regeneración *in vitro* de arándano *Vaccinium corymbosum* L. vía organogénesis está determinada por el medio de cultivo, el tipo y posición del explante, el balance de auxinas y citocininas y la concentración de la fuente de carbono.
2. Los tejidos mostraron una marcada polaridad en la respuesta morfogénica, los explantes colocados en forma horizontal en el medio de cultivo regeneraron más brotes.
3. La adición de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de 2iP, promovió la regeneración de brotes en 80 % de los explantes, éstos brotes fueron más largos, presentaron mayor número de hojas expandidas y mostraron mejor color y vigor que los brotes obtenidos con BA y Kin.
4. El balance fitohormonal 2-isopentiladenina ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) y ácido naftalenacético ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) favoreció el número de explantes con brote, la longitud, la cantidad de hojas expandidas, pero también influye en un mejor vigor y color del brote.
5. La fuente de carbono mejoró la capacidad callogénica de los explantes, las masas de callo más grande se obtuvieron con  $40$  y  $50 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa, aunque la calidad de este disminuyó en la medida que se incrementó la dosis de sacarosa.
6. Con el medio Woody Plant Medium Modificado los explantes produjeron dos veces más callo que los tejidos cultivados en medio Woody Plant Medium normal.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Amiot M, Forget F, Goulpy P (1996)** Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *Herbapolonica* 42:237-247.
- Azofeifa A (2009)** Problemas de oxidación y oscurecimiento en explantes cultivados *in vitro*. *Redalyc* 20(1):153-175.
- Barba A A, Romero A J (2001)** Propagación *in vitro*, *In: Micropropagación de plantas*, Ed. Trillas. 107 p.
- Bray E, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000)** Responses to abiotic stresses. *In: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. Biochemistry and molecular biology of plants*. American society of plant Physiologists Maryland, USA. pp: 1158-1203.
- Buzeta A. (1997)**. Chile: Berries para el 2000. Santiago, Fundación Chile. 133p
- Cao X, Hammerschlag F (2000)** Improved shoot Organogenesis from Leaf Explants of Highbush Blueberry. *Hortscience* 35(5):945-947.
- Cao X, Hammerschlag F (2002)** A Two-step Pretreatment significantly enhances Shoot Organogenesis from Leaf Explants of Highbush Blueberry cv. Bluecrop. *Hortscience* 37(5):819-821.
- Cao X, Fordham I, Douglas L, Hammerschlag FA (2003)** Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from *in vitro* propagated highbush blueberry shoots. *Plant cell tissue organ cult* 75:255-259.
- Caso O H (1992)** Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas. *Agriscientia* 9 (1): 5-16.

- Cobelo L. (2004)** El príncipe azul entre los berries suplemento Rural, diario Clarín.
- Debnath S C, McRae K B (2002)** An efficient shoot regeneration system on excised leaves of micropropagated lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). J Hortic Sci Biotechnol 77: 744-752.
- Debnath S C (2005)** Micropropagation of lingonberry: influence of genotype, explant, orientation, and overcoming TDZ-induced inhibition of shoot elongation using zeatina. Hortscience 40: 189-192.
- Debnath S C (2008)** Zeatin-induced one-step *in vitro* cloning affects the vegetative growth of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait) micropropagules over stem cuttings. Plant Cell tiss organ cult 93:231-240.
- Debnath S C (2009)** A two step procedure for adventitious shoot regeneration on excised leaves of lowbush blueberry. *In vitro* cell.dev.biol.-Plant. 45:122-128.
- Dwikat I, Lyrene P (1988)** Adventitious shoot production from leaves of blueberry cultured *in vitro*. Hortscience 23:629.
- Escalera J C (2009)** Propagación vegetativa de arándano *Vaccinium corymbosum* L. en Los Reyes Michoacán. Febrero. 34 p.
- Eccher T, Noé N (1989)** Comparison between 2iP and zeatin in the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*). Acta Horticulturae 241:185-190.
- Fabiani A, Martínez C, Carlazara G (2001)** Cultivo de Arándano en la zona del río Uruguay. Concordia, Argentina.
- FAO/PNUMA (1996)** Técnicas convencionales y Biotecnología para la propagación de plantas en zonas áridas. FAO guía conservación No.9. pp:8-14

**Fundación Jalisco, 2007.**

**Fundación Chile, 2000**

**George E (1993)** Plant propagation by tissue culture. Part 1: in practice. Exegetics, Edington.

**Hartmann H T, Kester D E (1998)** Techniques of *in vitro* culture of micropropagation. *In:* Plant regeneration. Principles and Practices. Hartmann H.T. and D.E. Kester (eds.) Sixth Edition. Prentice Hall New Jersey. pp: 549-608.

**Huetteman C, Preece J (1993)** Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 33:105-119.

**Jaakola L A, Tolvanen K L, Hohtola A (2002)** Micropropagation of Bilberry and Lingonberry. *Acta Horticulturae* 574:401-403.

**Jones R (2004)** Productor de arándanos de Oliveros, Provincia de Santa Fe, Argentina.

**Kaldmäe H, Karp K, Paal T (2006)** Effect of donor plant physiological condition on *in vitro* establishment of *Vaccinium angustifolium* shoot explants. *Acta Horticulturae* 715: 433-438.

**Li C, Olavi J, Tapio P (2004)** Environmental regulation and physiological basis of freezing tolerance in woody plants. *Acta physiologiae plantarum* 26: 213-222.

**Marcotrigiano M, McGlew S P (1991)** A two-stage micropropagation system for cranberries. *J Am Soc Hort Sci* 116:911-916.

**Marcotrigiano M, McGlew S P, Hachett G, Chawla B (1996)** Shoot regeneration from tissue-cultured leaves of the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). *Plant cell Tiss Org Cult* 44:195-199.

- Meiners J, Schwab M, Szankowski I (2007)** Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species. Plant cell Tiss Org Cult 89:169-176.
- Olivera V, Gutiérrez M, Gutiérrez J, Andrade M (2000)** Cultivo *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero.
- Ostroluká M G, Libiaková G, Ondrusková E, Gajdosová E (2004)** *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. Acta Universitatis Latviensis. Vol. 676: 207-212.
- Pereira M J (2006)** Conservation of *Vaccinium cylindraceum* smith (ericaceae) by micropropagation using seedling nodal explants. Society by *in vitro* biology. 12: 65-68.
- Pierik R L M. (1990)** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. España. 346 p.
- Pritts M, Hancock J (1992)** Highbush Blueberry Production Guide. New York, Northeast Regional Agricultural Engineering Service. 200p.
- Reed B M, Abdeltour-Esquivel A (1991)** The use of zeatina to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. Hortscience 26(10):1320-1322.
- Rowland L J, Ogden E L (1992)** Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf sections of Highbush blueberry. HortScience 27:1127-1129.
- Severín C, Di Sapio O, Scandizzi, Taleb L, Giubileo G, Gattusso S (2008)** Efecto de algunos fitorreguladores y estudios histológico sobre la regeneración *in vitro* de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. 7(1):18-24.
- Villegas M, Parada P (2009)** Propagación *in vitro* del híbrido almendro x durazno H1. Revista Fitotecnica Mexicana. 32: 103-109.

**Vinterhalter D, Vinterhalter B, Calovic M (1997)** The relationship between sucrose and cytokinins in the regulation of growth and branching in potato cv. Desire shoot cultures. Hortscience 18: 319-322

**Yadong L, Huayu Ma, Zhidong Z, Wilin (2006)** Effect of cytokinins *in vitro* leaf regeneration of blueberry. Acta Horticulturae 715: 417-419.

**Zhang Z. H, Liu L, Wu Y. Li (2006)** Technical System of Blueberry Micropropagation in China. Actahorticulturae 715: 421-426.

## VII. APÉNDICE

**Cuadro 1A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración de benciladenina (BA) sobre el número de explantes con brote en *Vaccinium corymbosum* L.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Concentración de BA	4	4.7794	1.1949	5.21	0.0114
Error	12	2.7500	0.2292		
Total	16	7.5294			

Pr≤0.05

**Cuadro 2A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración de benciladenina (BA) sobre la longitud de brotes de *Vaccinium corymbosum* L.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Concentración de BA	4	1.8317	0.4579	3.24	0.0510
Error	12	1.6983	0.1415		
Total	16	3.5300			

Pr≤0.05

**Cuadro 3A. Análisis de varianza para efecto de diferentes hormonas (BA, 2iP y Kinetina) sobre el número de explantes con brotes en *Vaccinium corymbosum* L.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Tratamiento hormonas	6	33.5429	5.5905	17.01	<0.0001
Error	28	9.2000	0.3286		
Total	34	42.7428			

Pr≤0.05

**Cuadro 4A. Análisis de varianza para efecto de diferentes hormonas (BA, 2iP y Kinetina) sobre la longitud de brotes de *Vaccinium corymbosum* L. propagados in vitro.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Tratamiento hormonas	6	45.7714	7.6286	11.36	<0.0001
Error	28	18.8000	0.6714		
Total	34	64.5714			

Pr≤0.05

**Cuadro 5A. Análisis de varianza para efecto de diferentes hormonas (BA, 2iP y Kinetina) sobre el número de hojas expandidas de brotes de *Vaccinium corymbosum* propagados in vitro**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Tratamiento hormonas	6	12.3429	2.0571	8.47	<0.0001
Error	28	6.8000	0.2429		
Total	34	19.1429			

Pr≤0.05

**Cuadro 6A. Análisis de varianza para efecto de diferentes hormonas (BA, 2iP y Kinetina) sobre el vigor de brotes de *Vaccinium corymbosum* L. propagados in vitro.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Tratamiento hormonas	6	11.1429	1.8571	9.29	<0.0001
Error	28	5.6000	0.2000		
Total	34	16.7429			

Pr≤0.05

**Cuadro 7A. Análisis de varianza para efecto de diferentes hormonas (BA, 2iP y Kinetina) sobre el color de brotes de *Vaccinium corymbosum* L. propagados in vitro.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Tratamiento hormonas	6	7.8857	1.3143	5.41	0.0008
Error	28	6.8000	0.2429		
Total	34	14.6857			

Pr≤0.05

**Cuadro 8A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración de 2iP sobre la longitud de brotes de *Vaccinium corymbosum* L. propagados in vitro.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Concentración de 2iP	4	0.8600	0.2150	1.39	0.2741
Error	20	3.1000	0.1550		
Total	24	3.9600			

Pr≤0.05

**Cuadro 9A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración de 2iP sobre el número de hojas expandidas de brotes de *Vaccinium corymbosum* L. propagados in vitro.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Concentración de 2iP	4	6.5600	1.6400	1.00	0.4307
Error	20	32.8000	1.6400		
Total	24	39.3600			

Pr≤0.05

**Cuadro 9A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración de 2iP sobre el vigor de brotes de *Vaccinium corymbosum* L. propagados in vitro.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Concentración de 2iP	4	2.8000	0.7000	1.94	0.1423
Error	20	7.2000	0.3600		
Total	24	10.0000			

Pr≤0.05

**Cuadro 10A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración de 2iP sobre el color de brotes de *Vaccinium corymbosum* L. propagados in vitro.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Concentración de 2iP	4	6.5600	1.6400	5.13	0.0052
Error	20	6.4000	0.3200		
Total	24	12.9600			

Pr≤0.05

**Cuadro 11A. Análisis de varianza para el efecto del balance 2iP y ANA sobre el número de explantes con brote en *Vaccinium corymbosum* L.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Concentración 2iP y ANA	4	0.6400	0.1600	0.25	0.9063
Error	20	12.8000	0.6400		

Total	24	13.4400
-------	----	---------

Pr<0.05

**Cuadro 12A. Análisis de varianza para el efecto del balance 2iP y ANA sobre la longitud de brotes *Vaccinium corymbosum* L.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Tratamiento 2iP y ANA	4	5.8600	1.4650	7.92	0.0005
Error	20	3.7000	0.1850		
Total	24	9.5600			

Pr<0.05

**Cuadro 13A. Análisis de varianza para el efecto del balance 2iP y ANA sobre el número de hojas expandidas de brotes de *Vaccinium corymbosum* L.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Tratamiento 2iP y ANA	4	192.2500	48.0625	infin	<0.0001
Error	20	0.0000	0.0000		
Total	24	192.2500			

Pr<0.05

**Cuadro 14A. Análisis de varianza para el efecto del balance 2iP y ANA sobre el vigor de brotes de *Vaccinium corymbosum* L.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Tratamiento 2iP y ANA	4	11.0000	2.7500	infin	<0.0001
Error	20	0.0000	0.0000		
Total	24	11.0000			

Pr<0.05

**Cuadro 15A. Análisis de varianza para el efecto del balance 2iP y ANA sobre el color de brotes de *Vaccinium corymbosum* L.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Tratamiento 2iP y ANA	4	16.0000	4.0000	infin	<0.0001

Error	20	0.0000	0.0000
Total	24	16.0000	

Pr≤0.05

**Cuadro 16A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración de la fuente de carbono sobre el diámetro del callo en explantes de *Vaccinium corymbosum* L.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Tratamiento F. de carbono	4	17.0400	4.2600	3.23	0.0338
Error	20	26.4000	1.3200		
Total	24	43.4400			

Pr≤0.05

**Cuadro 17A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración de la fuente de carbono sobre el peso de materia fresca de callo a partir de explantes de *Vaccinium corymbosum*.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Tratamiento F. de carbono	4	0.3037	0.0759	1.60	0.2138
Error	20	0.9506	0.04753		
Total	24	1.2543			

Pr≤0.05

**Cuadro 18A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración de la fuente de carbono sobre la apariencia del callo de *Vaccinium corymbosum*.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Tratamiento F. de carbono	4	7.8045	1.9511	4.64	0.0103
Error	17	7.1500	0.4205		
Total	21	14.9545			

Pr≤0.05

**Cuadro 19A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración de la fuente de carbono sobre el número de explantes con necrosis de *Vaccinium corymbosum*.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	Pr>F
Tratamiento F. de carbono	4	19.4391	4.8598	10.54	0.0001
Error	18	8.3000	0.4611		

---

Total	22	27.7391
-------	----	---------

---

Pr≤0.05