

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN
DIRECCIÓN DE PROYECTOS**

**INFORME FINAL DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN
Arándano: Una opción para la diversificación
de la agricultura en zonas altas II Fase**

**MSc. Vilma Jiménez Bonilla
Dra. Ana Abdelnour Esquivel**

2017

Índice

Índice	2
Resumen	4
Summary.....	4
Introducción	5
Materiales y Métodos	5
Recolecta	5
Propagación vegetativa tradicional.....	6
Germinación de semillas <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i>	6
Establecimiento <i>in vitro</i> de estacas	6
Brotación <i>in vitro</i> de estacas	7
Estimulación de la brotación por medio de choques térmicos.....	8
Multiplicación <i>in vitro</i> de brotes	8
Resultados	8
Recolecta	8
Propagación vegetativa tradicional.....	9
Germinación de semillas <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i>	10
Establecimiento <i>in vitro</i> de estacas	11
Brotación <i>in vitro</i> de estacas	13
Estimulación de la brotación por medio de choques térmicos.....	13
Multiplicación de brotes.....	14
Discusión.....	16
Literatura citada	18

Código y Título del proyecto:

Arándano: Una opción para la diversificación de la agricultura en zonas altas. II FASE

Autores y direcciones: MSc. Vilma Jiménez Bonilla, Coordinadora
vijimenez@itcr.ac.cr
Dra. Ana Abdelnour Esquivel
aabdelnour@itcr.ac.cr

Resumen

Vaccinium consanguinium es un arándano nativo de Costa Rica que presenta cualidades nutricionales y antioxidantes que lo hace un fruto de alto valor medicinal y nutricional. Su adaptación a las zonas altas del país lo posiciona como especie de interés, por lo que, disponer de técnicas para la obtención de material de siembra clonal es recomendable. El objetivo de esta investigación fue continuar con el desarrollo del protocolo para la micropropagación de esta especie. Se validó la etapa de establecimiento *in vitro* y se incluyó el uso de desinfectantes más efectivos como la combinación de jabón enzimático (5 ml.l⁻¹) y hipoclorito de sodio (3% *i.a.*) en esta etapa. Se logró establecer material de campo en el invernadero mediante la siembra de plantas, enraizamiento de estacas y germinación de semillas sin necesidad de usar ningún tipo de reguladores de crecimiento y se observó 100% de supervivencia y adaptación a las condiciones ambientales del invernadero. Una señal de la adaptación mostrada por las plantas recolectadas en el campo fue que el 40% presentó floración y fructificación. Con las estacas establecidas asépticamente se evaluó el efecto de tres reguladores del crecimiento en el medio de cultivo WPM al 50%, BA (0, 3, 5, 10, 15 y 20 mg.l⁻¹), Z (0, 0,1, 0.5 mg.l⁻¹), observándose que ambas citocininas fueron efectivas en concentraciones de 3 mg.l⁻¹ y 0,1 mg.l⁻¹ respectivamente, pero el mejor procedimiento para la brotación y multiplicación consistió en la exposición de las microestacas a un choque térmico a 5°C por 15 días, utilizando el mismo medio con 120 gl⁻¹ de sacarosa y 0,1 mg.l⁻¹ de Z. Posteriormente, los materiales fueron transferidos al medio WPM líquido suplementado con 30 gl⁻¹ de sacarosa y 0,1 mg.l⁻¹ de Z con puente de papel de filtro, lo que disminuyó la oxidación de los explantes y mejoró las condiciones nutricionales del cultivo reflejándose en mayor crecimiento y mejor apariencia de los brotes.

Summary

Vaccinium consanguinium, blueberry native to Costa Rica, presents nutritional and antioxidant qualities that makes it a fruit of high medicinal and nutritional value. Its adaptation to the highlands of the country places it as a species of interest, so that having techniques for obtaining clonal planting material are advisable.

The objective of this research was to continue the development of the protocol for the micropropagation of this species. The *in vitro* establishment stage was validated and the use of more effective disinfectants such as the combination of enzymatic soap (5 ml.l⁻¹) and sodium hypochlorite (3% *i.a.*) was included at this stage.

It was possible to establish field material in the greenhouse by sowing plants, rooting cuttings and seed germination without using any type of growth regulators, 100% survival and adaptation to environmental conditions of the greenhouse were observed. A sign of the adaptation shown by the plants harvested in the field was that 40% presented flowering and fruiting. With the aseptically established stakes, the effect of three growth regulators in 50% WPM culture medium, BA (0, 3, 5, 10, 15 and 20 mg.l⁻¹) and Z (0, 0.5 mg.l⁻¹), both cytokinin being effective at concentrations of 3 mg.l⁻¹ and 0.1 mg.l⁻¹ respectively, but the best procedure for sprouting and multiplication consisted in exposing the micro-cuttings to a heat shock at 5° C for 15 days, using the same medium with 120 gl⁻¹ of sucrose and 0.1 mg.l⁻¹ of Z. Subsequently, the materials were transferred to the liquid WPM medium supplemented with 30 gl⁻¹ sucrose and 0.1 mg.l⁻¹ of Z with a filter paper bridge, which reduced the oxidation of the explants and improved the nutritional conditions of the culture, being reflected in higher growth and better appearance of the outbreaks.

Palabras clave: *Vaccinium*, arándano, micropropagación, multiplicación *in vitro*, dormancia, citocininas

Key words: *Vaccinium*, blueberry, micropropagation, *in vitro* multiplication, dormancy, cytokinin

Introducción

Varias especies de *Vaccinium* son valiosas por sus frutos comestibles y por ser una excelente fuente de nutrientes que promueven la salud, contienen fibras dietéticas, antioxidantes (vitamina C, betacaroteno, ácido fólico, antocianinas), presentan agentes antifúngicos, como antocianósidos y ácido benzoico. Los frutos se consumen como productos frescos o procesados, tales como congelados, enlatados, líquidos, concentrados y productos secos, como conservas, dulces, jaleas, jugos, jarabes, helados, pastas, así como suplementos nutricionales y productos farmacéuticos (Ostrolucka *et al.*, 2007). En las últimas décadas se ha presentado un aumento en la demanda de arándanos y los frutos han alcanzado precios atractivos en el mercado, lo que ha estimulado el incremento en el área de cultivo en todo el mundo. Con el fin de satisfacer la creciente demanda de plántulas de arándano, se recomienda la micropropagación como el enfoque más apropiado para disponer de altos volúmenes de material de siembra élite, para satisfacer la demanda de los productores y la siembra a gran escala (Litwinczuk 2013). La micropropagación de materiales, variedades e híbridos, de este género en varias especies especialmente *V. corymbosum* está bien documentada, pero se afirma que la habilidad de regeneración *in vitro* es altamente dependiente del genotipo y por lo tanto, es necesario hacer algunas modificaciones en el protocolo para los diferentes cultivares (Litwinczuk 2013, Ostrolucka *et al.*, 2007, Gonzalez *et al.* 2000, Reed y Abdelnour-Esquivel 1991). En Costa Rica, el arándano es una de las especies silvestres cuya domesticación ha despertado gran interés, ya que es horticulturalmente promisorio y está bien adaptado a zonas altas. El arándano nativo, *Vaccinium consanguineum*, presenta altos contenidos de antioxidantes al igual que otras especies de este género (Jiménez-Bonilla y Abdelnour-Esquivel 2013). Este material nativo ha sido establecido asépticamente, observándose una lenta brotación y desarrollo de sus yemas latentes, aún en presencia de reguladores de crecimientos (Jimenez-Bonilla y Abdelnour-Esquivel 2016). No existen reportes adicionales de la domesticación de *V. consanguinium*, ni tampoco de su cultivo *in vitro*.

El presente proyecto tuvo como objetivo desarrollar investigación conducente a establecer un protocolo para la multiplicación y enraizamiento de los brotes obtenidos de explantes de *V. consanguinium* producidos *in vitro*, con el fin de contar, a mediano plazo, con una metodología para la producción masiva y disponer de material de siembra para promover su cultivo e incentivar la diversificación de la actividad agrícola, principalmente en zonas altas, vulnerables o erosionadas por la intensiva explotación hortícola.

Materiales y Métodos

Recolecta

Una vez alcanzado el objetivo de contar con un protocolo de desinfección y establecimiento *in vitro* (Jiménez-Bonilla y Abdelnour-Esquivel 2016), durante el 2015 y 2016 se realizaron diez giras de recolecta por año a los sitios denominados Cerro Buena Vista, localizado en Las Torres en el Cerro de la Muerte, Volcán Irazú y Volcán Turrialba. Estas recolectas permitieron disponer de suficiente germoplasma para continuar desarrollando el protocolo de establecimiento y multiplicación de brotes.

Se recolectaron tallos jóvenes poco lignificados y fueron trasladados al laboratorio de cultivo de tejidos del CIB para realizar el establecimiento *in vitro*. También fueron recolectados estacas lignificadas, plantas y frutos. Las plantas y estacas fueron sembradas en macetas en el invernadero, a los frutos se les extrajeron las semillas, las cuales fueron sembradas en sustrato estéril en el invernadero y en medio de cultivo MS simple en condiciones *in vitro*. La siembra en invernadero se realizó con el objetivo de establecer el material de interés en etapa 0 (pretratamiento de desinfección, fertilización y control fitosanitario en condiciones de invernadero), de manera que el material experimental a introducir al cultivo *in vitro* estuviera fácilmente disponible cerca del laboratorio de cultivo de tejidos y a la vez poder realizar algunas pruebas de propagación vegetativa por enraizamiento de estacas.

Propagación vegetativa tradicional

Se realizaron dos ensayos de propagación vegetativa tradicional. Para cada ensayo se utilizaron siete estacas semi leñosas de arándano de 5 mm de diámetro y 20 cm de largo. Las estacas fueron sumergidas en 0, 5 y 600 ppm de Ácido indolbutírico (AIB) durante 10 minutos y sembradas en sustrato de turba (Giffy®) con una cúpula plástica para la protección de la humedad. Esta se retiró una vez que el desarrollo de los brotes fue evidente.

Germinación de semillas *in vitro* y *ex vitro*

Los ensayos de germinación de semillas se realizaron utilizando los frutos maduros. Estos fueron desinfectados utilizando una solución de NaClO 3% *i.a* por 10 minutos y posteriormente fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar. Se inoculó 1 semilla por tubo de ensayo conteniendo 10 ml de medio de cultivo WPM al 50% de la concentración de sales y con 0, 1, 1,5 y 3 mgL⁻¹ de AG₃ para un total de 20 semillas por tratamiento y el ensayo se repitió dos veces. Las semillas fueron cultivadas en condiciones de luz intensa (26 μM·s⁻¹·m⁻²), 22 °C y un fotoperiodo de 16 horas. La germinación fue evaluada después de seis meses.

En condiciones *ex vitro*, los ensayos para la germinación de semillas se realizaron en bandejas plásticas de almácigo con sustrato de turba. Las semillas fueron extraídas del fruto y lavadas con agua corriente antes de su siembra. Cuarenta y ocho semillas por bandeja fueron sembradas y el ensayo se repitió dos veces. La germinación final fue evaluada después de seis meses y las plántulas fueron trasplantadas a macetas dos meses después.

Establecimiento *in vitro* de estacas

En resultados obtenidos en ensayos anteriores para el establecimiento *in vitro* de los arándanos nativos (Jiménez-Bonilla y Abdelnour-Esquivel 2016), se recomendó la desinfección con una solución de cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0.175% durante 6 minutos. En esta investigación fueron evaluados otros tratamientos que no utilizaron HgCl₂, sino sustancias con menor toxicidad como el Hipoclorito de sodio NaOCl, Jabón quirúrgico, Jabón enzimático, Zero tolerance®, Oxvirid®, Peróxido de hidrógeno, adicionalmente se mantuvo la incubación en Agrimicin y benlate durante 30 min (Cuadro 1).

Cuadro 1. Desinfección de estacas de arándano (*Vaccinium consangineum*) para el establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	Desinfectante	Concentración	Tiempo de incubación
1	Jabón quirúrgico Agrimicyn® y Benlate® +Tween 20 NaClO + tween 20 Zero tolerance	150 mL ⁻¹ 4 gL ⁻¹ 3% <i>i.a</i> 3% <i>i.a</i>	10 min en agitación 30 min en agitación 10 min en agitación 10 min en agitación
2	Jabón quirúrgico Agrimicyn y Benlate +Tween 20® NaClO + tween 20® Ox Virin	150 mL ⁻¹ 4 gL ⁻¹ 3% <i>i.a</i> 3% <i>i.a</i>	10 min en agitación 30 min en agitación 10 min en agitación 10min en agitación
3	Jabón quirúrgico Agrimicyn y Benlate +Tween 20® NaClO + tween 20®	150 mL ⁻¹ 4 gL ⁻¹ 3% <i>i.a</i> 3% <i>i.a</i>	10 min en agitación 30 min en agitación 5 min en agitación 10 min
4	Jabón enzimático Agrimicyn y Benlate +Tween 20® NaClO + tween 20®	5 mL ⁻¹ 4 gL ⁻¹ 3% <i>i.a</i>	10 min en agitación 30 min en agitación 10 min en agitación

Posterior al tratamiento de desinfección, las estacas (explantes) fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril en la cámara de transferencia de flujo laminar. Mientras se realizaba la siembra en los tubos de cultivo (15 x 3 mm), los explantes se mantuvieron en una solución antioxidante de 500mgL⁻¹ de ácido cítrico y 1 gL⁻¹ de ácido ascórbico (previamente esterilizados). Inicialmente las estacas fueron sembradas en los tubos de ensayo conteniendo 10 ml del medio WPM (Lloyd y McCown 1980) al 50% de su concentración y fue suplementado con 3 mgL⁻¹ BA + 500 mgL⁻¹ carbón activado. El pH se ajustó a 5,7. En cada introducción y establecimiento *in vitro* se sembraron 40 estacas con tres repeticiones en cada introducción.

Los tubos conteniendo los explantes fueron colocados en el cuarto de crecimiento en condiciones de oscuridad por 8 días a una temperatura de 21°C a 22°C. Posteriormente se mantuvieron en el mismo cuarto de crecimiento pero en luz directa (26 μM·s⁻¹·m⁻²), con un fotoperiodo de 16 horas luz.

Brotación *in vitro* de estacas

Con las estacas establecidas asépticamente se evaluó el efecto de tres reguladores del crecimiento en el medio de cultivo WPM al 50% de su concentración. Se evaluó BA (0, 3, 5, 10, 15 y 20 mgL⁻¹), zeatina (Z) (0, 0,1, 0.5). La unidad experimental consistió de 1 explante por envase de cultivo con 40 repeticiones y cada experimento se repitió al menos dos veces. Las evaluaciones se realizaron semanalmente durante 14 semanas. Se evaluó el porcentaje de explantes mostrando indicios de brotación (yemas hinchadas, elongadas y brotadas).

Estimulación de la brotación por medio de choques térmicos

También se estudió la exposición del material establecido asépticamente a choques térmicos para estudiar su efecto sobre la brotación de las yemas. Fueron evaluadas temperaturas de 30 °C durante 4 días y de 35 °C durante 2, 3, 5 y 6 días utilizando una incubadora. También fue evaluada la incubación en cámara fría a 5°C durante 4 y 7 días. En todos los ensayos se mantuvo un tratamiento testigo a 25°C ± 2 (temperatura del cuarto de crecimiento). El medio de cultivo para las pruebas en altas temperaturas consistió en un WPM al 50% y con 3 mgL⁻¹ de BAP y 30g⁻¹ de sacarosa. Para las pruebas en bajas temperaturas el medio fue enriquecido con 120 gL⁻¹ de sacarosa y se evaluó también el medio de cultivo con 0,1mg⁻¹ de Z. Cada unidad experimental consistió de 1 explante por envase de cultivo con 80 repeticiones y cada experimento se repitió al menos dos veces. Pasados los periodos de cultivo en altas y baja temperatura, los explantes fueron cultivados en el mismo medio descrito, excepto aquellos que venían del tratamiento en frío, en el cual la sacarosa fue disminuida a 30 gL⁻¹. La evaluación se realizó semanalmente durante 8 semanas, tomando en cuenta el número de explantes oxidados y muertos, yemas elongadas y brotados.

Posteriormente se estableció una prueba para evaluar el efecto la exposición de los explantes a la baja temperatura por un mayor periodo (15 días a 5°C) en el medio de cultivo que contenía 0,1 mgL⁻¹ Z y 120 gL⁻¹ de sacarosa. Igualmente, los explantes fueron subcultivados en el mismo medio de cultivo pero disminuyendo la sacarosa a 30 gL⁻¹. La brotación se evaluó después de 8 semanas en el cuarto de cultivo a 25°C.

Multiplicación *in vitro* de brotes

Todos los brotes obtenidos en los diferentes ensayos fueron separados del explante inicial (estaca) y subcultivados en dos sistemas de cultivo: medio semisólido (WPM al 50%), enriquecido con 3 mgL⁻¹ de BAP y el mismo medio pero líquido estacionario con puente de papel, enriquecido con 0,1 de Z, ambos con 30 gL⁻¹ de sacarosa.

Resultados

Recolecta

Las giras de recolecta se realizaron quincenalmente. No hubo problemas con la disponibilidad de material experimental ya que los arbustos son perennes. Se pudieron observar diferentes etapas reproductivas, fisiológicas y sanitarias dependiendo de la época de la colecta, lo que tuvo un efecto en el establecimiento aséptico de los materiales, que se reflejó en los tratamientos de desinfección y brotación. Se observó que el periodo comprendido entre mayo y julio fue el más recomendable para la colecta, por la respuesta positiva de los explantes al cultivo *in vitro*, ya que este periodo corresponde a la fase vegetativa de las plantas.

De las plantas recolectadas para sembrar en el invernadero como fuente de material experimental para los ensayos *in vitro*, se observó 100% de supervivencia y adaptación a las condiciones ambientales del invernadero. Una señal de su adaptación fue que el 40% presentó floración y fructificación.



Figura 1. Plantas de arándano (*Vaccinium consanguineum*) procedentes del Cerro Buena Vista, localizado en Las Torres en el Cerro de la Muerte y sembradas en invernadero como fuente de material experimental.

Propagación vegetativa tradicional

El 80% de las estacas enraizaron después de 5 meses de sembradas, sin embargo, con base en los tratamientos con el AIB, no se observaron diferencias ni en el porcentaje de enraizamiento ni en el periodo para desarrollar las raíces, incluyendo al testigo sin el regulador del crecimiento. En cuanto a la brotación de las yemas, se observó el engrosamiento y elongación de las mismas después seis meses siembra, desarrollándose los brotes 9 meses después de la siembra de las estacas. (Figura 2)



Figura 2. Estacas de arándano (*Vaccinium consanguineum*) propagadas vegetativamente después de 1 año de cultivo en invernadero.

Germinación de semillas *in vitro* y *ex vitro*

Se observó que el proceso de germinación de las semillas de arándano fue muy lento, tanto *in vitro* como *ex vitro* (Figura 3). El mayor porcentaje de germinación se observó cuando las semillas fueron expuestas a condiciones *ex vitro* para su germinación, observándose que la germinación de las semillas *ex vitro* inició después de 9 semanas de la siembra en invernadero y a los 3 meses el 24% logró germinar (Figuras 3).

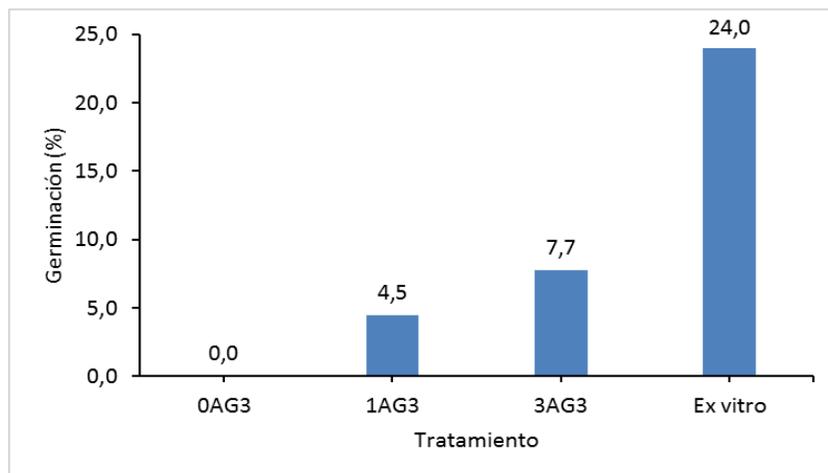


Figura 3. Germinación de semillas de arándano (*Vaccinium consanguineum*) *in vitro* con y sin la adición de ácido giberélico al medio de cultivo y *ex vitro* sin la adición del regulador del crecimiento.



Figura 4. Plantas germinadas a partir de semillas de arándano (*Vaccinium consanguineum*) después de un año de cultivo en condiciones de invernadero.

En condiciones *in vitro* se observaron los menores porcentajes de germinación de las semillas 0 a 7%. Se evidenció que aquellos tratamientos que contenían AG₃ fueron los que mostraron respuesta y que a mayores concentraciones de este regulador se observó mayor respuesta germinativa (Figura 3 y 5). Sin embargo, al cabo de un año, las plántulas no presentaron mayor crecimiento en medio de cultivo WPM 50% renovado cada 3 meses (Figura 6).



Figura 5. Plantas de arándano generadas a partir de semillas germinadas en condiciones *in vitro*. A) Plántula desarrollada después de 4 meses de la siembra de la semilla. B) Plántulas desarrolladas después de un año de cultivo y transferidas cada tres meses a medio fresco.

Establecimiento *in vitro* de estacas

Al analizar los 4 tratamientos utilizados para la desinfección de estacas (Figura 6) se observó una diferencia entre aquellos tratamientos que utilizaron el desinfectante Zero Tolerance (Tratamiento 1) y Ox virid (Tratamiento 2), y aquellos que solamente utilizaron NaClO, jabón quirúrgico y jabón enzimático (Tratamientos 3 y 4). Los explantes desinfectados con los tratamientos con Zero tolerance y Ox virin mostraron mayor presencia de hongo y bacteria y oxidación respectivamente, que los

explantes de los tratamientos 3 y 4 (Figura 6). Asimismo, se observó que manteniendo la misma composición del desinfectante, pero cambiando el jabón quirúrgico (Tratamiento 3) por el jabón enzimático (Tratamiento 4) se mejoró considerablemente el porcentaje de explantes supervivientes, ya que se redujo la contaminación y la oxidación.

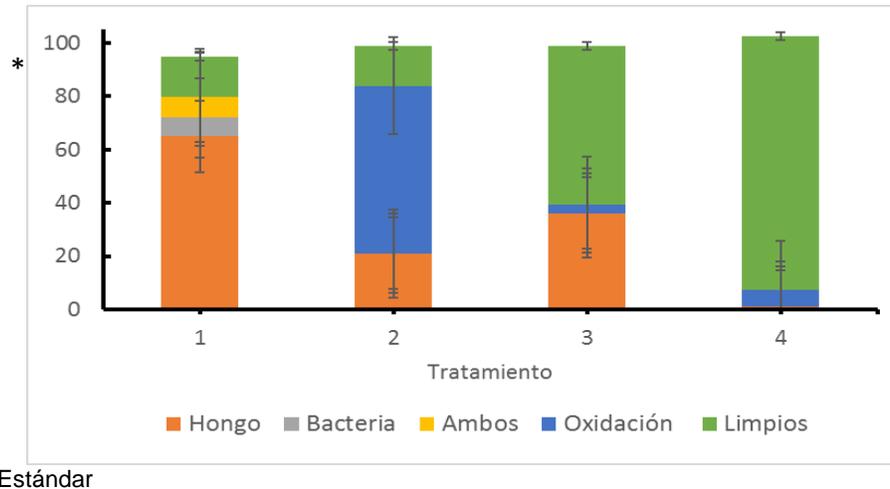


Figura 6. Efectividad de los tratamientos de desinfección en estacas de arándano (*Vaccinium consangineum*) para el establecimiento *in vitro*.

Durante las siguientes introducciones se utilizó en Tratamiento 4 para las desinfecciones y se analizó la respuesta de los explantes recolectados en diferentes sitios, con condiciones climáticas diferentes (Figura 7). Los resultados obtenidos fueron muy variables, se observó que el material del arándano proveniente del Cerro Buenavista (Las Torres) presentó los mayores porcentajes de supervivencia, asimismo el mayor porcentaje de explantes limpios. Por otra parte, los explantes provenientes tanto de invernadero como del Volcán Turrialba e Irazú no presentaron oxidación o bajos porcentajes, pero todos los explantes limpios, indistinto de la procedencia del material, permanecieron latentes sin que se observaran indicios de brotación de yemas.

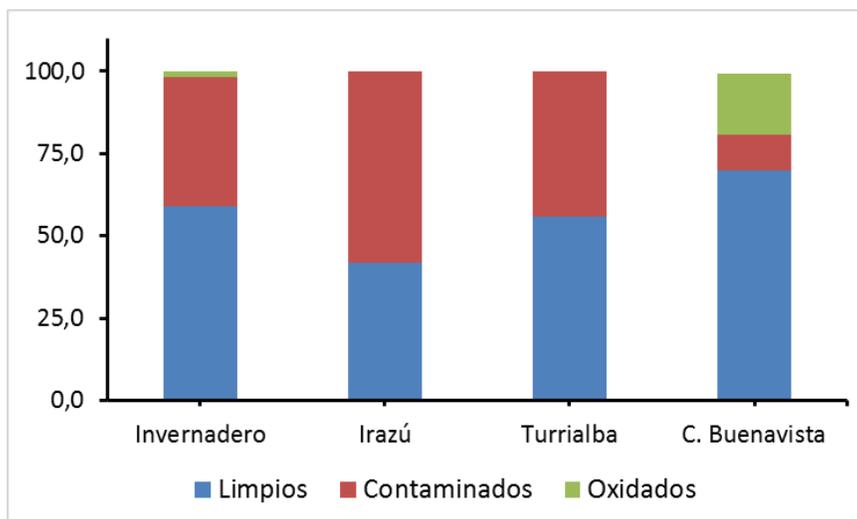


Figura 8. Porcentaje de sobrevivencia a la desinfección según sitio de colecta para el tratamiento de desinfección 4.

Brotación *in vitro* de estacas

Al evaluar los diferentes reguladores del crecimiento, en varias concentraciones, se observó que la zeatina (Z) en bajas concentraciones (0,5, 1 y 3 mgL⁻¹) indujo la brotación de yemas en porcentajes que alcanzaron 7,1, 8,9 y 11,5% respectivamente. Solamente aquellos explantes cultivados en presencia de BAP en las menores concentraciones evaluadas (3 y 5 mgL⁻¹) indujeron brotación en 23,8% y 12% respectivamente. Los explantes cultivados en mayores concentraciones de BAP presentaron formación de callo, mostrando los puntos de crecimiento de una organogénesis indirecta (Figuras 9).

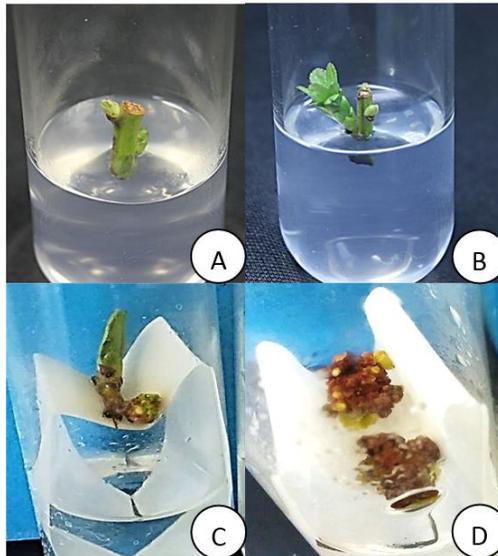


Figura 9. Brotación de estacas de arándano (*Vaccinium consanguineum*) en medio de cultivo con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento: (A) Zeatina 0,5 mgL⁻¹, (B) Benciladenina 3 mgL⁻¹, (C) Benciladenina 5 mgL⁻¹, (D) Benciladenina 10 mgL⁻¹.

Estimulación de la brotación por medio de choques térmicos

Al exponer el material establecido asépticamente a temperaturas de 35 y 30°C se observaron porcentajes de oxidación que oscilaron entre 82,4 a 51,3% y al final del periodo de evaluación todos estos explantes habían muerto.

Cuando los explantes fueron expuestos a 5°C durante 4, 7 y 15 días, los porcentajes de oxidación fueron menores, observándose valores entre 22,4% y 12,3% de oxidación y la brotación total de los

explantes expuestos al frío por estos períodos fue de 20% y la calidad de estos brotes fue superior a aquellos obtenidos de explantes sin el pretratamiento en frío. Sin embargo, aún los explantes oxidados mostraron indicios de brotación a las cuatro semanas de cultivo a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en el cuarto de crecimiento, pero murieron posteriormente (Figura 11).



Figura 11. Estacas de arándano (*Vaccinium consanguinium*) oxidadas mostrando brotación, después de la incubación a 5°C durante 7 días y luego transferidas al cuarto de cultivo a 25°C .

La prueba de incubación en frío se repitió utilizando el mismo medio de cultivo con 120 mgL^{-1} de sacarosa y $0,1\text{ mgL}^{-1}$ de Z, ya que fue el tratamiento que presentó mayor supervivencia de los brotes, menor oxidación y mayor brotación. En este ensayo se obtuvo 25% de brotación de explantes y estos brotes fueron utilizados para las pruebas de multiplicación.



Figura 12. Brote de arándano (*Vaccinium consanguinium*) cultivado en presencia de $0,1\text{ mgL}^{-1}$ Zeatina proveniente la incubación a 5°C por 15 días.

Multiplicación de brotes.

Los brotes obtenidos de los ensayos realizados fueron separados de la estaca y se evaluaron dos sistemas de cultivo: en medio semi sólido 3mgL^{-1} de BA (Figura 12) y en medio líquido estacionario con puente y 3 mgL^{-1} de BA o $0,1\text{ mgL}^{-1}$ de Z (Figura 13). Después de tres semanas de cultivo, el

70% de los brotes en el primer sistema mostraron oxidación, caída de hojas y muerte. Al utilizar el sistema de medio líquido con puente y 3 mgL^{-1} de BAP se observó que los brotes se oxidaron y murieron, confirmando que en esta investigación la adición de BAP para la multiplicación de los brotes no es efectiva. Por otra parte, aquellos brotes cultivados en presencia de Z prosperaron y disminuyó la oxidación e inclusive se observó enraizamiento en un brote en ese medio (Figura 13). A la fecha de finalización de esta investigación, la tasa de multiplicación observada a partir de los primeros brotes cultivados para la multiplicación en el medio de cultivo WPM al 50% con 30 gL^{-1} de sacarosa y $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de Z fue de un 33,5% (Figura 14).



Figura 12. Multiplicación de brotes de arándano (*Vaccinium consanguineum*) en medio de cultivo WPM al 50% complementado con 3 mgL^{-1} de BAP (Benciladenina).

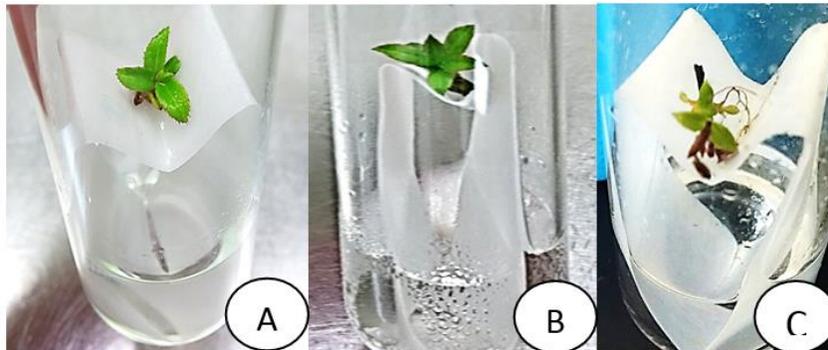


Figura 13. Multiplicación de brotes de arándano (*Vaccinium consanguineum*) en medio de cultivo WPM al 50% complementado con $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ Z líquido con soporte. A. y B. Brotes y C. Brote enraizado.

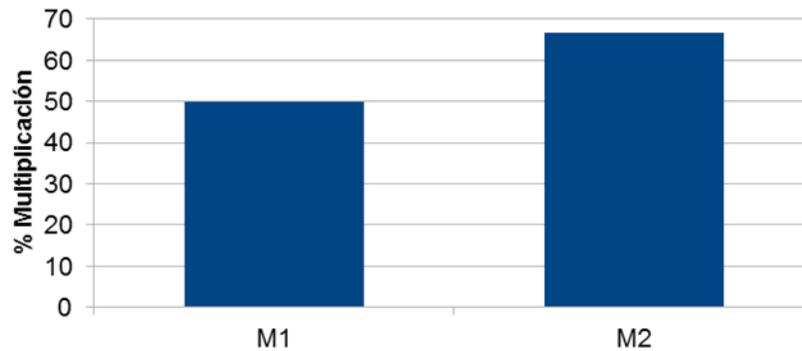


Figura 14. M1: Brotes de arándano (*Vaccinium consanguinium*) en la primera etapa de multiplicación. M2: Brotes totales provenientes de los obtenidos a partir de M1.

Discusión

A pesar de que no hubo limitación con la disponibilidad de material, la época de recolecta fue importante en la respuesta positiva de los explantes, tanto a la desinfección como a la brotación de las yemas, coincidiendo éste con el periodo de crecimiento vegetativo de los árboles y las mayores temperaturas del año en la zona (mayo a julio). Resultados similares fueron observados por Victoriano (2010) en la especie *V. corymbosum*, al recolectar las estacas a introducir *in vitro* durante el inicio de la primavera, pasado el periodo de bajas temperaturas del invierno.

Se menciona que la propagación en invernadero de estacas de arándano se dificulta por presentar bajos porcentajes y lenta respuesta al enraizamiento, aun cuando se utilizan enraizadores (Victorino 2010). Sin embargo, en los resultados observados en esta investigación las estacas mostraron un alto porcentaje de enraizamiento, con o sin enraizadores, pero al igual que con *V. corymbosum*, el desarrollo de raíces fue lento, lo mismo que la inducción de brotes que se utilizaron como fuente de material experimental para los ensayos *in vitro*.

En general, la propagación de arándanos por semillas no es muy utilizada debido a la germinación errática y al largo periodo que toma, por lo que es utilizada principalmente en programas de mejoramiento genético (Mendoza 2014). Las semillas de *V. consanguinium* también mostraron un lento proceso de germinación, tanto *ex vitro* como *in vitro*, observándose el mayor periodo de germinación en las semillas cultivadas *in vitro*. El ácido giberélico (GA_3) se utiliza como promotor o inductor de la germinación en semillas de gran variedad de plantas y actúan fundamentalmente sobre el ARN desinhibiendo genes o activando enzimas (George *et al* 2008). Se ha utilizado en xerófitas (Mandujano *et al* 2007), forestales leñosas (Abdelnour-Esquivel 2007), *Jaltomata procumbens* (Saldívar *et al.* 2010), obteniéndose en esta última especie 87% de germinación cuando se utilizó a una concentración de 250 ppm en el medio de cultivo. Los porcentajes de germinación de las semillas en condiciones *ex vitro* e *in vitro*, parecen indicar que las concentraciones de ácido giberélico (GA_3) utilizadas *in vitro* no fueron las adecuadas para remplazar la necesidad de estímulos ambientales, tales como luz y temperatura (Araya *et al.* 2000).

Bacterias y hongos acompañan a las plantas en su ambiente natural, sin ser factores negativos sobre su desarrollo y crecimiento, sin embargo, cuando se cultivan en condiciones artificiales *in vitro*, se hace indispensable hacer una desinfección superficial de los tejidos a inocular, ya que el medio de cultivo proporciona un ambiente apropiado para la proliferación y colonización de éstos y compiten con los explantes por los componentes del medio de cultivo, pudiendo provocarles hasta la muerte (Orlkowsha *et al.* 2017). Las desinfecciones utilizadas para el establecimiento *in vitro* de los materiales experimentales deben ser suficientemente fuertes para eliminar los microorganismos pero provocar el menor daño al material vegetal (Perea y Tirado 2011). Durante la desinfección, los explantes sufren, en mayor o menor medida, situaciones de estrés, desecación y daños mecánicos que estimulan el metabolismo de los compuestos fenólicos (López, 2004) que son tóxicos para los tejidos vegetales, provocando cese del crecimiento, oscurecimiento de los tejidos y del medio de cultivo y en algunos casos la muerte del explante (George *et al.* 2008). Desinfectantes como Zero tolerance y Ox virin que contienen Peróxido de hidrógeno, Ácido peracético y Ácido acético, son frecuentemente utilizados para la desinfección superficial (Cristal Chemical 2000, Grupo Ox. 2014), sin embargo, en arándano no parecen ser recomendables, ya que no fueron efectivos para eliminar los microorganismos exógenos y provocaron oxidación y muerte de los explantes. Al substituir estos productos por jabones quirúrgico y enzimático se observó mayor porcentaje de sanidad en los explantes, siendo el enzimático el más efectivo, posiblemente por su contenido de amilasas, proteasas, lipasas y celulasas capaces de saponificar las grasas, surfactar, dispersar, suspender la suciedad y degradar cualquier materia orgánica, a diferencia de los jabones quirúrgicos que contienen clorhexidina gluconato y cloruro de cetrimonio que presentan actividad sobre ciertos virus y hongos pero no es efectivo contra esporas bacterianas (Eufar 2017, Steris 2007).

La etapa de multiplicación generalmente comprende dos períodos, la fase de inducción de brotes y la fase de multiplicación propiamente dicha. En investigaciones previas con *V. consanguinium* (Jiménez-Bonilla y Abdelnour-Esquivel 2016) se logró observar el hinchamiento y el inicio de la apertura de las yemas, como una señal de activación del crecimiento, pero no se logró su apertura total ni la multiplicación. Los reguladores de crecimiento y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la inducción y brotación de los explantes. Experiencias en la micropropagación de arándano y otras bayas muestran que la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo favoreció la brotación y multiplicación y por lo general, se recomienda el uso de BAP, 2ip y Zeatina en varias concentraciones, siendo más efectivas las más bajas (Stoevska *et al.* 1995, Gonzalez *et al.* 2000, Lambardi *et al.* 2013, Jiménez-Bonilla y Abdelnour-Esquivel 2016). El empleo de concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento favorecen la desdiferenciación y formación de callo (George *et al.* 2008). Al igual que en otros estudios con arándano, en esta investigación se observó que reguladores de tipo citocininas, especialmente BAP y zeatina en bajas concentraciones promovieron la brotación de las yemas y las mayores concentraciones evaluadas promovieron la formación de callo, a partir del cual se observó el inicio de organogénesis. La organogénesis indirecta es una vía de mayor proliferación de brotes pero implica mayor riesgo de variación somaclonal (George *et al.* 2008).

Los choques térmicos, tanto con altas como con bajas temperaturas son estrategias utilizadas para promover la germinación de semillas (Pukacka y Ratajczak, 2014), la brotación de bulbos dormantes (Sun *et al.* 2007) la erradicación de virus en material vegetativo (Hu *et al.* 2015) y la brotación de yemas dormantes (Wu *et al.* 2009). Como el arándano es una especie de clima templado, la entrada de las temperaturas más cálidas de la primavera promueven la brotación en algunos de los genotipos, por lo que los tratamientos con calor podrían verse prometedores con el material nativo bajo estudio, tratamiento que no resultó efectivo, causando fuerte oxidación y muerte de los explantes pretratados con calor. Por el contrario, en *Rubus* y varias especies de *Vaccinium* (Malagi *et al.* 2015), los tratamientos con bajas temperaturas, por lo general 4°C por periodos de hasta de 6 semanas estimularon significativamente la brotación, resultados similares a los observados en esta investigación

con *V. consanguinium*, sin embargo, los porcentajes de brotación observados fueron menores a los obtenidos en las especies mencionadas, pero la calidad del brote obtenido fue superior a los obtenidos sin tratamiento de frío. Es posible que si el tratamiento en frío se hubiese prolongado por más de las dos semanas como recomiendan Wu *et al.* (2009) la brotación podría haber sido mayor y es un parámetro a considerar en futuras investigaciones. La combinación de frío, alta concentración de sacarosa durante el pretratamiento en frío y la presencia de zeatina en baja concentración en el medio fue la combinación de mayor respuesta a la brotación en esta investigación.

En la actualidad existe una tendencia general a buscar sistemas que empleen medios líquidos, con el fin de reducir costos por la eliminación del gelificante y la mayor agilidad en la preparación de medios, pero esto puede traer problemas de hiperhidratación en los cultivos (Guiñazú *et al.* 2005). Cuando se trabaja con medio líquido sin un soporte, los tejidos quedan sumergidos y para una buena aireación es necesario agitarlos, por lo que se prefiere trabajar con soportes para los explantes, como espuma de plástico limpia, lana de vidrio, pequeñas bolas de vidrio y puente de papel, entre otros (Pierik 1990). En esta investigación, la utilización de medio líquido con puente de papel de filtro (puente Heller) resultó en una mejora en el protocolo de micropropagación, ya que los brotes presentaron menor oxidación y mejor apariencia. La presencia de compuestos fenólicos en el medio de cultivo dificulta el establecimiento de los explantes *in vitro*, ya que estas sustancias son reconocidas como inhibidores del crecimiento (Roy y Sarkar 1991). Los efectos negativos de la oxidación en medios líquidos es menor, ya que los fenoles se diluyen con mayor facilidad en este tipo de medios, afectando en menor grado el crecimiento de los explantes, ya que no permanecen en contacto directo con el medio (Albany *et al.* 2015). Etienne y Berthouly (2002) sugieren la elección del medio de cultivo líquido para el establecimiento de un protocolo más sencillo, eficiente y rentable en la fase de multiplicación; ya que la exclusión del agente gelificante puede disminuir hasta en un 60 % los costos y abre la posibilidad de la automatización de la micropropagación.

Según Pereira (2009) la micropropagación en especies leñosas domesticadas se utiliza de manera rutinaria; pero en especies que crecen de manera silvestre, la utilización de explantes de árboles adultos presenta algunos problemas, entre ellos contaminación, dormancia y baja respuesta morfogénica. Estas afirmaciones coinciden con los resultados obtenidos en esta investigación en la que se utilizó un arándano nativo no domesticado. Se puede agregar que superada la dormancia de este arándano nativo por medio de tratamiento de choque térmico a baja temperatura y bajas concentraciones de citocininas, se observó la brotación de las yemas pero un lento crecimiento y desarrollo de las mismas. De acuerdo con Castro-Restrepo y Álvarez-Guzmán (2013) el enraizamiento *in vitro* de la mayoría de especies del género *Vaccinium* no ha sido efectivo. En este proyecto no fue posible establecer ensayos de enraizamiento de brotes debido al lento crecimiento de la especie y a la limitante en el tiempo asignado para el desarrollo de la investigación, sin embargo, algunos de los brotes desarrollaron raíces en el medio de multiplicación.

Literatura citada

- Abdelnour-Esquivel, A., Rojas, G., Alfaro, U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en marcha*. 20(1): 98-103.
- Araya, E., Gómez, L., Hidalgo N., y Valverde, R. 2000. Efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de jaúl (*Alnus acuminata*). *Agron. Costarricense* 24(1), 75-80.

- ALBANY, N. Vilchez, J., León, S., Nava, A., Martínez, L., Molina, M. 2015. Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17: 24-31.
- Castro Restrepo, D., Álvarez-Guzmán, J. 2013 MICROPROPAGACIÓN CLONAL DE TRES GENOTIPOS MORTIÑO, *VACCINIUM MERIDIONALE* SW., POR PROLIFERACIÓN DE YEMAS AXILARES. *Actual Biol* 35 (99): 135-144
- Cristal Chemical. (2000). Zero Tolerance. Consultado el 20 de enero de 2017. Recuperado de: http://www.crystal-chemical.com/pagina_n17.htm
- De Asis, T., Teixeira, S. (1998). Enraizamiento de plantas leñosas. *Revista Cultura de Tejidos y Transformación Genética de Plantas* (1): 261-296.
- Etienne, H., Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215-231.
- Eufar. Jabón Quirúrgico. Consultado el 1 de marzo de 2017. Recuperado de: <https://system.netsuite.com/core/media/media.nl?id=3530&c=1192473&h=6ef5d499aadb27d4d86d&xt=.pdf>
- George, E., Hall, M.A., De Klerk, G. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 1. 3 ed. Springer. Pp.29-64.
- Gonzalez, M. V., Lopez, M., Valdes, A. E., Ordas, R. J. (2000). Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. *Annals of Applied Biology*, 137(1), 73-78.
- Grupo Ox. Ox-Virin Desinfectante Elite Ecológico y Efectivo. Parque Tecnológico Walqa. Zaragoza, España. Consultado el 1 de marzo de 2017. Recuperado de: <http://protegamayorista.com/wp-content/uploads/2014/12/Ficha-OX-VIRIN-Multiespecie-SPA-07102014email.pdf>
- Guiñazú, M., Ponce, M., Guzmán, J., Juárez, J., Cirrincione, M. (2005). Micropropagación de VID. Protocolo para variedades "Criollas". *Revista FCA UNCuyo*, 37(2), 93-103.
- Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., Ren, F.; Zhou, J. 2015 *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 121: 435-443.
- Jiménez-Bonilla, V., Abdelnour-Esquivel, A. 2016. Establecimiento *in vitro* de (*Vaccinium consanguineum*), un arándano nativo de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. 29:77-84
- Jiménez-Bonilla, V., Abdelnour-Esquivel, A. 2013. Identificación y valor nutricional de algunos materiales nativos de arándano (*Vaccinium* spp). *Revista Tecnología en Marcha* 26:3-8.
- Lambardi, M., Ozudogru, E. A., Jain, S. M. (Eds.). (2013). *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants*. Humana Press.
- Litwinczuk, L. 2013. Micropropagation of *Vaccinium* sp. by In Vitro Axillary Shoot Proliferation. In: *Protocols for Micropropagation of Selected Economically Important Horticultural Plants*.

Lambardi, M; ozudogru, EA, Jain, SM. (Eds.). Humana Press, Springer. Pp. 63-79. doi: 10.1007/978-1-62703-074-8

Lloyd, G., McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30:421-427.

López, E. 2004. Reacciones de hipersensibilidad en plantas cultivadas in vitro. Estación Experimental de la Mayorca CSI. Disponible en <[http:// www. Ciencias .uma.es/publicaciones/ ENCUENTROS 26/reacciones .html](http://www.Ciencias.uma.es/publicaciones/ENCUENTROS26/reacciones.html)>

Malagi, G., Robson Sachet, M., Citadin, I., Herter, F., Bonhomme, M., Jean-Luc Regnard, J., Legave, J. 2015. Trees 29: 1365.

Mandujano, M., Golubov, J., Aréchiga, M. (2007). Efecto del ácido giberélico en la germinación de tres especies del género *Opuntia* (Cactaceae) del Desierto Chihuahuense. En Cactaceas y suculentas mexicanas 52(2):46-52

McCown, BH. 2000. Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: Dealing with genetic predeterminism. In Vitro Cellular and Developmental Biology 36 (3): 149-154.

Mendoza, W. 2014. Efecto sinérgico de Kelpac y 2,4-D en el enraizamiento de *Vaccinium floribundum* Kunth "pushgay". Tesis para optar por el título de Biólogo. Universidad Nacional de Trujillo, Perú. 28p.

Orlikowska, T., Nowak, K., Reed, B. 2017. Bateria in the plant tissue culture environment. Plant Cell Tiss Organ Cult 128: 487-508.

Ostrolucka, M. G., Gajdosova, A., Libiakova, G., Hrubíkova, K., Bezo, M. 2007. Protocol for micropropagation of selected *Vaccinium* spp. In *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits* (pp. 445-455). Springer Netherlands.

Perea, M., Tirado, A. 2011. Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro (Manual de prácticas de laboratorio). Editorial Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Pp. 21-41

Pereira, MJ. 2009. Reversion to juvenility: the use of epicormics in the micropropagation of mature wild shrubs of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae). Archipelago Life and Marine Sciences 26: 63-68.

Pierik, R. 1990. Preparación y composición de medios nutritivos. Revista Cultivo in Vitro de Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. P. 49-84.

Pukacka, S., Ratajczak, E. 2014. Factors influencing the storability of *Fagus sylvatica* L. seeds after release from dormancy. Plant Growth Regul. 72:17-27

Reed, BM., Abdelnour-Esquivel, A. 1991. The use of zeatina to initiate in Vitro Cultures of *Vaccinium* species and cultivars. HortScience 26:1320-1322

- Rodríguez, M. Propagación de Arándanos. Chile, Universidad Católica de Temuco Escuela de Agronomía, Facultad de Recursos Naturales. Consultado el 2 de diciembre de 2016. Recuperado de: www.blueberrieschile.cl/wp-content/uploads/2015/07/pdf_000060.pdf
- Roy, S. C., y Sarkar, A. 1991. In vitro regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. *Scientia Horticulturae* 47(1): 107-113.
- Saldívar, P., Laguna, A., Gutiérrez, F., Domínguez. 2010. Ácido giberélico en la Germinación de semillas de *Jaltomata procumbens* (Cav.) J. L. Gentry1 *agronomía mesoamericana* 21(2):327-331. ISSN: 1021-7444
- Steris. 2007. Detergente enzimático. Consultado el 20 de febrero de 2017. Recuperado de: https://www.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/hrs3/fileadmin/user_upload/area_servicios_generales/prevencion_riesgoslaborales/fichas_seguridad/detergente_enzimatico_steris.pdf
- Stoevska, T., Trifonova, A., Karadocheva, D. 1995. Micropropagation of Raspberries (*Rubus Idaeus*), *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 9:2-3: 27-30. DOI: 10.1080/13102818.1995.10818837
- Sun, H. M., Jaime, A. T., Li, Y. F., Li, T. L. 2007. Effects of low temperature on dormancy release in lily bulbs. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 1(1): 41-45.
- Victoriano, H. 2010. Organogénesis *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). Tesis Maestro en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable. Instituto Politécnico Nacional, Michoacán, Mexico. 50p.
- Yu, D., Meredith, C. 1986. The influence of explant origin of tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine 111(6): 972-975
- Wu, J. H., Miller, S. A., Hall, H. K., Mooney, P. A. 2009. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99(1): 17-25.