

**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**

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

2015

Tabla de contenido

Resumen4

Introducción5

Materiales y Métodos9

 Recolecta9

 Establecimiento *in vitro*.....9

 Brotación 11

Resultados 12

 Recolecta 12

 Establecimiento *in vitro*..... 12

 Brotación 14

Discusión y conclusiones 16

 Establecimiento *in vitro*..... 16

 Brotación inicial del material..... 17

Literatura citada ¡Error! Marcador no definido.

Código y Título del proyecto:

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

Autores y direcciones:

MSc. Vilma Jiménez Bonilla, Coordinadora

vijimenez@itcr.ac.cr

Dra. Ana Abdelnour Esquivel

aabdelnour@itcr.ac.cr

Resumen

El arándano (Ericaceae, *Vaccinium* spp) es una baya de color oscuro, azulada. Constituye una de las fuentes más importantes de antocianos y carotenoides que le confieren propiedades antioxidantes. Sus frutas son de bajo valor calórico, ricas en vitamina C, potasio, hierro y calcio. Hay seis especies nativas en nuestro territorio, que se distribuyen en un rango altitudinal entre 1500 y 3500 m.s.n.m., en los bosques montanos de la cordillera de Talamanca, Cerro de la Muerte y en los alrededores del volcán Irazú. Tiene gran potencial para exportación y para industrialización a nivel nacional, además; nuestro país cuenta con suelos y climas favorables para este cultivo. Como gran atractivo adicional, estudios recientes indicaron los altos contenidos de antioxidantes de los materiales nativos de Costa Rica. Por estas razones el arándano se incluyó como línea de investigación en el área de cultivos no tradicionales del Programa Nacional de Fruticultura. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo de establecimiento, brotación y desarrollo de yemas latentes de un material nativo de arándano, como una primera etapa del proyecto, con el fin de contar con material aséptico que permitiera continuar, en una segunda fase, que sería el desarrollo de las siguientes etapas del proceso de micropropagación. Para el establecimiento *in vitro* se utilizaron mini estacas tomadas directamente del campo, con 2 y 3 nudos, se lavaron con abundante agua y jabón por 30 minutos, posteriormente se desinfectaron con varias soluciones desinfectantes como hipoclorito de sodio y calcio y HgCl₂ en varias concentraciones. La solución que permitió los mayores porcentajes de estacas establecidas asépticamente fue HgCl₂ al 0.2% por durante 5 minutos. El medio utilizado fue un WPM con 1g/l de carbón activado. Las estacas establecidas asépticamente se utilizaron para evaluar el efecto de varios reguladores del crecimiento en la brotación de las yemas. Se evaluaron zeatina (Z), BA y kinetina (K), 2ip, TDZ entre otros, en concentraciones de 0, 0,5, 1, 1,5 y 2, 3,5, 10 mg/l. Al evaluar los diferentes reguladores de crecimiento no se observó brotación de las mini estacas con ninguno de los reguladores de crecimiento ni en ninguna de las concentraciones evaluadas, excepto las mini estacas cultivadas en zeatina, que mostraron ensanchamiento de las yemas. Por lo que se continúa evaluando concentraciones de 5, 10 y 15 mg/L de las citocininas con el fin de estimular el desarrollo de las yemas para iniciar el proceso de multiplicación.

Palabras clave: *Vaccinium*, micropropagación, multiplicación *in vitro*, enraizamiento *in vitro*, citocininas, auxinas, arándano.

Introducción

El arándano es un arbusto de la familia de las Ericáceas, género *Vaccinium*. Sus frutos son bayas de color oscuro, azuladas o rojizas, ricas en antocianos y minerales. Estas cualidades lo hace un fruto de alto valor medicinal y nutricional. En la alimentación humana, el arándano constituye una de las fuentes más importantes de antocianos y carotenoides, que les confieren su color característico y propiedades antioxidantes. Estas frutas son de bajo valor calórico, ricas en vitamina C, potasio, hierro y calcio, necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso, para la actividad muscular normal e intervienen en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula. Adicionalmente, constituyen una buena fuente de fibra que mejora el tránsito intestinal (INTA, 2011).

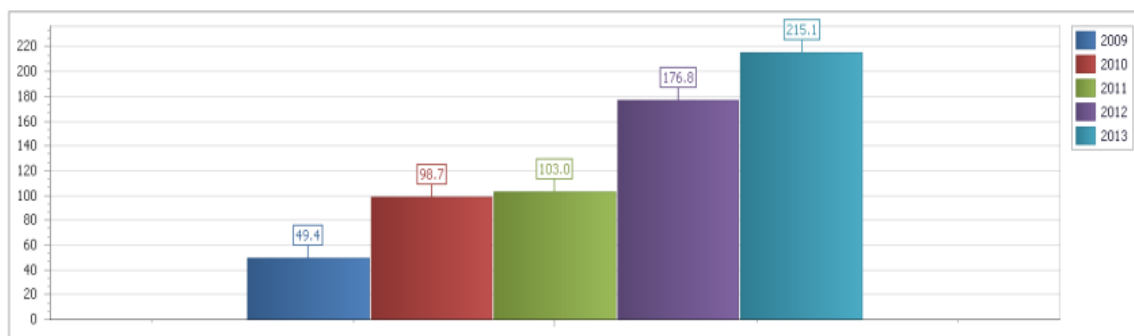
También contiene taninos que le confieren propiedades astringentes y la mayor propiedad de esta fruta son sus altos contenidos de antocianos y vitaminas que intervienen en la formación de colágeno, huesos y dientes, glóbulos rojos y favorece la absorción del hierro de los alimentos y la resistencia a las infecciones (Ostrolucka *et al.*, 2007). Los compuestos antioxidantes en arándano son flavonoides y ácidos fenólicos y los flavonoides se mencionan como antioxidantes particularmente poderosos (INTA, 2011). Los pigmentos naturales, junto con ácidos orgánicos como el oxálico y el málico, son los responsables de su sabor. En general, los antioxidantes pueden ayudar a conferir protección contra enfermedades como el cáncer, cardio y cerebro vasculares y arteriosclerosis (Ostrolucka *et al.*, 200).

Abundante evidencia indica que el efecto dañino de los radicales libres en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos puede ser neutralizado por los antioxidantes y debido a que las frutas y vegetales contienen diferentes compuestos y niveles de éstos, el interés por determinar y comparar sus niveles se ha convertido en un área de interés. Existen varios métodos para determinar la capacidad antioxidante de un alimento y entre ellos se mencionan el TEAC (Tolox Equivalente Antioxidant Capacity, DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) y el ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity o Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno). Sin embargo, existe consenso en que para caracterizar la actividad antioxidante de un alimento, el ensayo ORAC se destaca, por su alta sensibilidad, precisión y reproductividad, ya que permite medir la actividad o capacidad global que tienen todos los antioxidantes presentes en una muestra para neutralizar radicales peróxido, es decir, mide el aporte que hacen a la capacidad antioxidante tanto los polifenoles, como aquellos compuestos de naturaleza no fenólica, lo que permite comparar alimentos de naturaleza muy diversa en cuanto a su capacidad antioxidante (INTA, 2011).

El arándano es una de las frutas con mayores contenidos de antioxidantes y de tipo flavonoide, lo que ha estimulado su consumo a nivel mundial. A pesar de la creencia en el país de que esta fruta es foránea, hay varias especies de este género presentes en el territorio, que se distribuyen en un rango altitudinal entre 1500 y 3500 m.s.n.m., en los bosques montanos de la cordillera de Talamanca y en los alrededores del volcán Irazú.

En Costa Rica, el arándano es una de las especies silvestres cuya domesticación ha despertado gran interés, ya que es horticulturalmente promisorio (Montero, 2010). Este cultivo tiene gran potencial para exportación y para industrialización a nivel nacional; además; nuestro país cuenta con suelos y climas favorables para este cultivo (MADRIZ, 1999). Por estas razones el arándano se incluyó como línea de investigación en el área de cultivos no tradicionales del Programa Nacional de Fruticultura (Montero, Comunicación personal, Gerente del Programa Nacional de Frutas no tradicionales del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) San José, Costa Rica).

Desde hace algunos años los principales supermercados del país importan esta fruta procesada en diferentes presentaciones (jugos, mermeladas, toppings, pasteles y otros) y más recientemente como fruta congelada. PROCOMER (2012) señala que las frutas de *Vaccinium* se importan desde Chile, Colombia, México y Estados Unidos y que las divisas invertidas para su importación han ido en aumento en los últimos años, pasando de US\$ 48.000 en el 2007 a US\$ 215.100 en el 2013, lo que muestra el aumento en el consumo nacional de estas frutas (Fig. 1). Sin embargo, por su alto precio en el mercado nacional, su consumo está probablemente limitado a un sector selecto de la población.



Fuente: <http://servicios.procomer.go.cr/estadísticas/inio.aspx>. (Consultado 5/3/ 2014)

Figura 1. Consumo de arándano en Costa Rica

Las especies silvestres de arándano en el país producen frutos comparables en color y tamaño a los frutos importados (figura 2). Pero no existía información sobre sus cualidades nutricionales y antioxidantes.



Figura 2. Frutos de *Vaccinium consanguineum*

Estudios recientes (Jiménez-Bonilla y Abdelnour-Esquivel, 2013) confirmaron el valor nutricional del arándano nativo (cuadro 1). Se compararon los índices de actividad antioxidante mostrados para arándanos comerciales (94 y 92 μM de Trolox equivalente/g muestra fresca) (INKANATURAL, 2008), los cuales son menores a los arrojados por los análisis de los arándanos silvestres en el estudio. Además, los valores reportados para ciruela (73), mora (53), frambuesa (48), manzana (43) y naranja (18) entre otros (INKANATURAL, 2008), muestran también valores muy inferiores a los determinados en los materiales silvestres analizados.

Con base en estos resultados, así como en la información sobre el aumento en el consumo de arándano y las crecientes divisas que invierte el país en la importación de productos a base de esta fruta, se evidenció la necesidad de incentivar y apoyar las iniciativas de domesticar estas plantas para introducirlas a producción comercial.

Cuadro 1. Valores de antioxidantes totales (Análisis ORAC con base en peso fresco y peso seco) en muestras de arándano (*Vaccinium consanguineum*) de diferentes localidades de Costa Rica.

Muestra	Humedad %	ORAC (μM de Trolox equivalente/g muestra fresca)	ORAC (μM de Trolox equivalente/g muestra seca)
Las Torres 1	76,8	131,58	564,6
Las Torres 2	76,9	156,20	676,19
Villa Mills	74,8	144,50	573,4
Quetzales	79,3	112,84	545,12

En arándano, la propagación por semilla es empleada únicamente en la investigación, para la producción de nuevas variedades, ya que este método de reproducción produce progenies muy heterogéneas (Ostrolucka *et al.*, 2008). Por lo tanto, una de las mayores limitantes para el establecimiento de plantaciones es la disponibilidad de material de siembra, ya que la multiplicación de variedades se lleva a cabo asexualmente, por estacas, sin embargo, su éxito es limitado debido al bajo rendimiento en el enraizamiento. Una alternativa para superar los problemas de propagación asexual tradicional es la micropropagación, técnica que permite la multiplicación clonal masiva y el rescate de variedades mejoradas y silvestres con características deseables (George, 2008).

Las investigaciones en el cultivo *in vitro* de arándano se han llevado a cabo principalmente en Estados Unidos de América, Eslovaquia, Polonia, Chile, Colombia, Argentina y Uruguay. Entre los sistemas de cultivo *in vitro* más utilizados está la micropropagación por estacas, en medios semi sólidos utilizando las sales minerales descritas por Murashige y Skoog (1962), o las de Lloyd y McCown (1981) (Medio para plantas leñosas) (Frett y Smagula 1983; Galdosova *et al.*, 2006; Rache-Cardenal y Pacheco 2010; Ross y Castillo 2009). Por lo general, se recomienda la adición de citocininas como benciladenina (BA), zeatina (Z), isopenteniladenina (Zip) y la cinetina (K) en concentraciones que varían de 0,5 hasta 15 mg/l dependiendo el estado fisiológico del explante inicial, siendo las concentraciones más elevadas las recomendadas cuando el explante inicial posee yemas apicales y axilares dormantes. Para la etapa de multiplicación las concentraciones son disminuidas, destacando los autores la eficiencia de la zeatina (Ostrolucka *et al.*, 2008; Plata 2002; Reed y Abdelnour-Esquivel 1991; Ross y Castillo 2009; Fira *et al.*, 2008). El enraizamiento de los brotes se ha evaluado tanto *in vitro* como *ex vitro* utilizando auxinas como el ácido indolbutírico (AIB) en el medio de cultivo, en concentraciones de 0,8 a 2 mg/l. En condiciones *ex vitro*, se ha utilizado la inmersión rápida de las vitroplantas en soluciones de 500 a 1,000 mg/l de AIB (Frett y Smagula 1983; Guan-jie *et al.*, 2008; Ostrolucka *et al.*, 2008; Plata 2002; Ross y Castillo 2009; Trevisan *et al.*, 2008).

En el país se han llevado a cabo escasas investigaciones en este tema, a pesar de que desde hace más de 20 años la Universidad de Costa Rica (UCR) mantiene una pequeña colección de campo (5 híbridos) en la Estación Experimental Fraijanes, con materiales introducidos del Banco de Germoplasma Clonal de USDA en Corvallis, Oregón (el Dr. Jorge Morera (Profesor UCR, comunicación personal). El investigador realizó pruebas de enraizamiento de estacas en invernadero, pero al igual que lo que reporta la literatura, el éxito en esta práctica fue muy limitado. Por otra parte, al experimentar con estos híbridos foráneos, se logró el establecimiento *in vitro* y brotación de uno de los materiales de la colección de Fraijanes (Hine-Gómez, Abdelnour-Esquivel 2013). De acuerdo con el Dr. Arturo Brenes del Centro de Investigaciones Agronómicas (Universidad de Costa Rica, comunicación personal), recientemente se logró la micropropagación de los materiales foráneos y se encuentran en evaluación por adaptabilidad y producción en el campo.

El presente proyecto tuvo como objetivo establecer las bases para desarrollar un protocolo de micropropagación de arándano nativo con valor comercial, con el fin de contar a mediano plazo con una metodología para la producción masiva y poder poner a disposición de los agricultores de las zonas altas del país, material de siembra de calidad, con tamaño, color y forma similar a los plantados en otros países, que presenta altos contenidos de antioxidantes y con la ventaja adicional de estar bien adaptados a Costa Rica. En conclusión, se trata de tomar ventaja de los materiales nativos que están siendo subutilizados y que tienen gran valor comercial.

Materiales y Métodos

Recolecta

Se seleccionó el material de arándano identificado previamente como “Las Torres 2”, localizado en el Cerro de la Muerte, que mostró, durante estudios previos, poseer las características deseables para la producción comercial (color, tamaño y sabor) y los mayores contenidos de antioxidantes de los materiales evaluados (cuadro 1). Se realizaron dieciséis giras de colecta por año. Se colectaron tallos jóvenes poco lignificados, éstos se envolvieron en papel toalla humedecida y se colocaron en una hielera para su traslado al laboratorio de cultivo de tejidos del CIB.

Establecimiento *in vitro*

Los tallos recolectados se seccionaron en estacas que contenían de 2 a 3 nudos. Se eliminaron las hojas. Posteriormente se lavaron con agua y jabón quirúrgico en forma individual con ayuda de un cepillo suave, se enjuagaron tres veces con abundante agua y se sometieron a diferentes tratamientos con desinfectantes (cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos desinfectantes, concentraciones y tiempos de incubación de las mini estacas de arándano (*Vaccinium consangineum*).

Tratamiento	Desinfectante	Concentración	Tiempo
1	Alcohol	70%	5min
	Benomyl, Agrimicin, Ferbán	6 g/l	60 min en agitación
	Hipoclorito de calcio	8%	10min en agitación
2	Alcohol	70%	5min
	Benomyl, Agrimicin, Ferbán.	6 g/l	60 min en agitación
	Hipoclorito de calcio	10%	10 min
3	Alcohol	70%	5min
	Benomyl, Agrimicin, Ferbán.	6 g/l	60 min en agitación
	Hipoclorito de sodio	1.5%	10 min
4	Alcohol	70%	5min
	Benomyl, Agrimicin, Ferbán.	6 g/l	60 min en agitación
	Hipoclorito de sodio	1.5%	20 min
5	Alcohol	70%	5min
	Benomyl, Agrimicin, Ferbán	6 g/l	60 min en agitación
	Hipoclorito de sodio	3%	10 min
6	Alcohol	70%	5min
	Benomyl, Agrimicin, Ferbán	6 g/l	60 min en agitación
	Hipoclorito de sodio	3%	15 min
7	Cloruro de mercurio (HgCl)	0.175%	5 minutos
8	Cloruro de mercurio (HgCl)	0.2%	5 minutos
9	Cloruro de mercurio (HgCl)	0.2%	6 minutos

Posterior a cada tratamiento de desinfección se realizaron al menos tres enjuagues con agua destilada estéril en la cámara de transferencia de flujo laminar y el material vegetal se mantuvo, durante la siembra en los envases de cultivo, en una solución antioxidante de 500mg/l de ácido cítrico y 250 m/l de ácido ascórbico (previamente esterilizados). Se sembró un explante por envase de cultivo conteniendo 20 ml del medio de descrito por Murashige y Skoog (MS) (1962) en ausencia de reguladores de crecimiento, con un pH ajustado a 5,7.

Los explantes se colocaron en el cuarto de crecimiento con una temperatura ambiente de 21°C a 22°C en la oscuridad por 8 días. Posteriormente se mantuvieron en el mismo cuarto de crecimiento pero en luz directa (2000 Lux), con un fotoperiodo de 16 horas luz. También se evaluó el efecto de temperaturas mayores y menores sobre la brotación de las yemas, colocando los explantes en un cuarto de crecimiento con una temperatura de 27°C y dándoles un pre tratamiento de frío a 5°C en la refrigeradora.

Cada unidad experimental consistió de 1 explante por envase de cultivo con 50 repeticiones y cada experimento se repitió al menos dos veces. La evaluación se realizó semanalmente durante ocho semanas, tomando en cuenta el número de explantes establecidos asépticamente, explantes contaminados (hongos-bacterias), oxidados y muertos.

Brotación

Las estacas establecidas asépticamente se utilizaron para evaluar el efecto de varios reguladores del crecimiento en la brotación de las yemas. El medio de cultivo utilizado durante esta etapa fue WPM (Woody Plant Medium, Medio para plantas leñosas) suplementado con 500mg/l de carbón activado, al que se adicionaron los siguientes reguladores de crecimiento: zeatina (Z), Bencil aminopurina (BA), kinetina (K), tidiazuron (TDZ), 2 Isopentenil adenina (2iP), Acido naftalenacético (ANA), en varias concentraciones y combinaciones (cuadro 3).

Cuadro 3: Reguladores de crecimiento y concentraciones utilizadas para la brotación *in vitro* de yemas de arándano (*Vaccinium consanguineum*).

Regulador de crecimiento	Concentración (mg/L)												
	0	0.05	0.10	0.20	0.30	0.50	1.0	2.0	2.5	3.0	5.0	10	15
BA	X					x	x	x	x	x	x	x	x
2ip	X					x	x		x		x	x	x
TDZ	X					x			x				
Zeatina	X	X	x	x	x		x		x	x	x	x	x
ANA	X					x	x						
AG3						x	x						

En cada ensayo 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 ocho semanas. Se evaluó el porcentaje de microestacas mostrando indicios de brotación y número de yemas reactivas por estaca.

Además se evaluó el efecto de la temperatura y la luz en la inducción de brotación, (las mini estacas recolectadas de campo fueron incubadas a 5°C a la oscuridad durante 1 y 2 semanas), se evaluó posición del explante en el medio de cultivo, colocando la mini estaca en posición vertical (solo la parte distal en contacto con el medio) y en posición horizontal sobre el medio (toda la mini estaca en contacto con el medio). Y también se utilizó el sistema de puente utilizando papel filtro como soporte en medio líquido.

Los datos se analizaron según la prueba de homocedasticidad (Bartlett) y la normalidad de residuos (Anderson-Darling, Ryan-Joiner, Kolmogorov-Smirnov) para validar la prueba ANOVA. Todos los análisis se realizaron con 95% de confianza ($p=0,05$).

Resultados

Recolecta

Las giras de recolecta se realizaron quincenalmente. No hubo problemas con la disponibilidad de material experimental ya que los arbustos son perennes, aunque éstos presentaron diferentes etapas reproductivas, fisiológicas y sanitarias a la hora de la recolecta, según el clima y época del año, lo que se reflejó en los tratamientos utilizados en la desinfección, brotación y los resultados obtenidos, encontrándose que el periodo comprendido entre mayo y julio fue el más recomendable por la respuesta de los explantes *in vitro*, por corresponder este periodo a fase vegetativa de las plantas.

Establecimiento in vitro

El ANOVA evidenció diferencias significativas entre los tratamientos. Para la desinfección, los tratamientos 1, 2, 3 y 4 resultaron estadísticamente iguales entre ellos. Sin embargo, los grupos 5 y 6 fueron diferentes a los primero mencionados, y los grupo 7 y 8 guardan similitud entre ellos y con el tratamiento 9. El tratamiento que permitió los menores porcentajes de oxidación de explantes fue el tratamiento 9 pero no fue estadísticamente diferente al 8. El uso de hipoclorito de calcio en las concentraciones y tiempos de incubación evaluados permitieron altos porcentajes de contaminación de mini estacas, lo mismo que los tratamientos que incluyeron la incubación en hipoclorito de sodio al 1,5% i.a. durante 10 y 20 min (tratamientos 1, 2, 3 y 4) (entre 80% y 90% de contaminación). Por otra parte, al aumentar la concentración de hipoclorito de sodio al 3% y realizar la incubación por 10 y 15 min, los porcentajes de contaminación disminuyeron significativamente (55% y 50% de mini estacas contaminadas respectivamente). El uso de cloruro de mercurio permitió la menor contaminación y el mayor porcentaje de explantes establecidos asépticamente. De acuerdo con el análisis estadístico, el mejor tratamiento consistió de la incubación en 0,2% de cloruro de mercurio durante 6 min (28% de contaminación) (figura 4A).

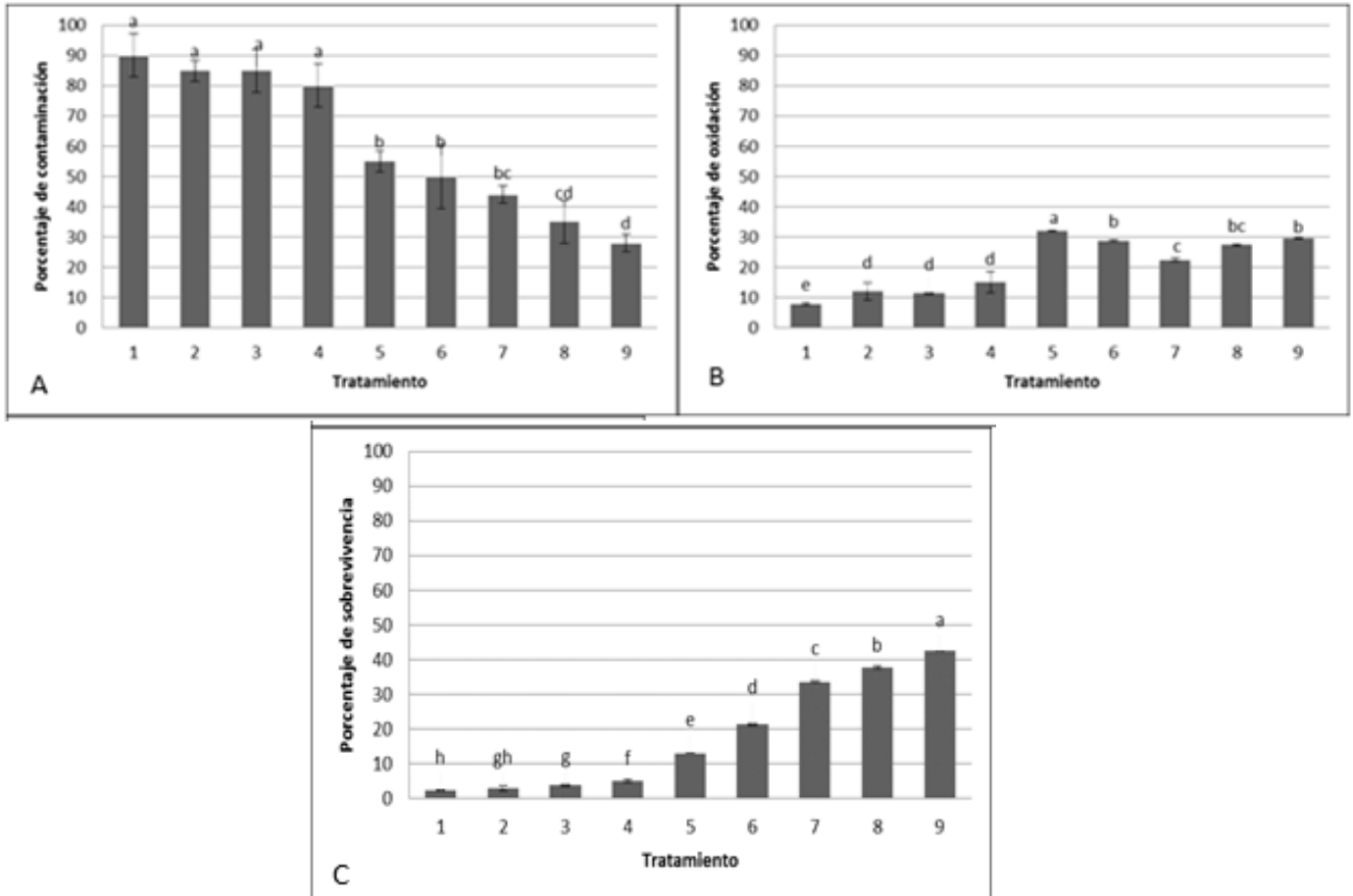


Figura 4. Contaminación (A), oxidación (B) y sobrevivencia (C) de mini estacas de arándano (*Vaccinium consanguineum*) según el tratamiento de desinfección, después de ocho semanas de cultivo.

También se evaluó la oxidación que presentaron las mini estacas de arándano con base en los tratamientos utilizados para la desinfección, después de ocho semanas de cultivo. La prueba de Fisher evidenció diferencias significativas entre los tratamientos. Los tratamientos 1 y 5 son significativamente diferentes con respecto a los demás, los tratamientos 2, 3 y 4 son estadísticamente iguales, los tratamientos 6, 8 y 9, también son estadísticamente similares entre ellos. Observándose los menores porcentajes de mini estacas oxidadas en los tratamientos, 7, 8 y 9 (40% de oxidación) (figura 4B).

En cuanto a la sobrevivencia de las mini estacas después de los tratamientos de desinfección (figura 4C), los mayores porcentajes de explantes sobrevivientes se observaron en los tratamientos 7, 8 y 9 (33,6%, 37,7% y 42,5% respectivamente, aunque son estadísticamente diferentes entre ellos. El tratamiento 9 permitió el mayor porcentaje de mini estacas sobrevivientes, luego de eliminar los explantes contaminados y oxidados.

Brotación

En esta etapa la oxidación de los explantes continuó siendo alta, por lo que se realizaron ensayos con diferentes temperaturas de cultivo. Al evaluar el efecto de la temperatura de cultivo en las mini estacas, se observó que aquellas cultivadas a 21°C, mostraron mayores porcentajes de sobrevivencia y menor oxidación que las cultivadas a 27°C, mostrando también mayores porcentajes de mortalidad (cuadro 4). Por lo que en los siguientes ensayos se cultivaron en cuarto de crecimiento a 21°C.

Cuadro 4. Oxidación y sobrevivencia de mini estacas de arándano (*Vaccinium consanguineum*) cultivadas en dos condiciones de temperatura del cuarto de crecimiento.

Condiciones de cultivo	Mini estacas oxidadas (%) ± ES	Mini estacas sobrevivientes (%) ± ES
21°C	4,8 ± 2,0	92 ± 1,5
27°C	20,4 ± 4,5	46 ± 11,3

Al evaluar los diferentes reguladores de crecimiento no se observó brotación de las mini estacas con ninguno de los reguladores de crecimiento ni en ninguna de las concentraciones evaluadas (datos no se muestran), excepto las mini estacas cultivadas en zeatina, en las cuales se observó ensanchamiento de las yemas (figura 7). Por lo anterior, se procedió a establecer ensayos con diferentes concentraciones de zeatina (cuadro 5).



Figura 7. Engrosamiento de yemas de arándano (*Vaccinium consanguineum*), cultivadas en zeatina

Cuadro 5. Efecto de la concentración de zeatina en la brotación de las mini estacas de arándano (*Vaccinium consanguineum*) cultivadas *in vitro*.

Zeatina (mg/l)	Mini estacas brotando (%)		
	1 ensayo	2 ensayo	3 ensayo
0	0	33	66
0,05	0	5	50
0,1	0	3	16
0,2	0	32	50
0,3	0	14	11
1	0	22	22
3	0	75	100
5	20	50	100
10	14	75	100

Con la adición de zeatina al medio de cultivo para la inducción de brotación (cuadro 5) se observó una respuesta de las mini estacas muy desuniforme. Esta respuesta a la brotación parece estar relacionada con la época del año de la recolecta, siendo los meses de mayo, junio y julio los más reactivos en cuanto a la respuesta de las yemas (ensayo 3). La respuesta observada fue yemas engrosadas y el inicio de su apertura. Adicionalmente, las mini estacas colocadas horizontalmente no mostraron diferencias en cuanto a la apertura de las yemas con respecto a las colocadas verticalmente en el medio de cultivo (figura 8).

Las mini estacas que fueron recolectadas e inmediatamente incubadas a 5°C en la oscuridad durante 1 y 2 semanas con el fin de estimular su posterior brotación, no mostraron la respuesta esperada. De igual manera, el sistema de separar la yema del explante original y cultivarla en medio líquido sobre un puente de papel de filtro, tampoco mostró efecto sobre la brotación, independientemente del regulador de crecimiento contenido en el medio de cultivo (figura 9).

Al finalizar el presente proyecto se logró el estímulo a la brotación, pero aún no se ha logrado la apertura total de las yemas. La segunda etapa del proyecto ya aprobada por la VIE permitirá continuar la investigación.



Figura 8. Engrosamiento de yemas de arándano (*Vaccinium consanguineum*) cultivadas en posición horizontal y vertical



Figura 9. Yemas de arándano (*Vaccinium consanguineum*) aisladas de la mini estaca y cultivadas directamente sobre el medio de cultivo o sobre puentes de papel filtro.

Discusión y conclusiones

Establecimiento *in vitro*

El material vegetativo traído directamente del campo posee en su superficie una abundante microflora que debe ser eliminada por medio de procedimientos de desinfección para cumplir con el establecimiento aséptico, el cual es la fase número uno y fundamental en cualquier metodología de propagación (George 2008). En los

primeros seis tratamientos de desinfección se combinó el uso de desinfectantes como biocidas de acción superficial (alcohol, hipoclorito de calcio y sodio) con dos sistémicos de amplio espectro, benomyl (Benlate®), y estreptomina y terramicina (Agri-mycin®) evaluando concentraciones y tiempos de exposición que no ocasionaran daños a los tejidos. Los resultados mostraron no ser los más efectivos para la descontaminación del material (figura 4), por lo que se debe tomar en cuenta que al ser material del campo, la probabilidad de contaminación por hongos y bacterias es grande ya que, el grado de contaminación está determinado por las condiciones climáticas de la región; es más difícil de obtener explantes limpios de plantas del trópico húmedo que de las regiones frías o secas (Rathore *et al*, 2007).

Por lo anterior, se recurrió al uso de cloruro de mercurio. El cloruro de mercurio se utiliza para la eliminación exófito de microorganismos, se menciona que tiene gran acción bacteriostática y fungicida en concentraciones mayores a 0.004% (Niubóu *et al*, 2004). En esta investigación se determinó que con el empleo de cloruro de mercurio al 0,02% durante 5 y 6 min se obtuvieron bajos porcentajes de contaminación, lo cual resultó muy efectivo. Tratamientos similares fueron efectivos para desinfectar propagulos de caña (Niubóu *et al*, 2004), teca (Abdelnour y Muñoz 2005) y amarillón (Mendez-Alvarez y Abdelnour-Esquivel 2014) entre otros.

Los explantes sufren durante la desinfección, en mayor o menor medida, situaciones de estrés, desecación, daños mecánicos que provocan la estimulación del metabolismo de compuestos fenólicos (López, 2004) que son tóxicos para los tejidos vegetales, provocando cese del crecimiento, oscurecimiento de los tejidos vegetales, exudados que oscurecen el medio de cultivo y en algunos casos causan la muerte del explante (Cáceres, 2006). En esta investigación la oxidación fue una variable de consideración que constituyó también uno de los problemas más serios y frecuentes y provocando la muerte del material, evidenciándose en los tratamientos de desinfección utilizando desinfectantes como alcohol e hipoclorito de calcio y sodio, que aumentaron los porcentajes de oxidación. Azofeifa (2009) sugiere que los problemas de oxidación podrían disminuirse con el uso de medio líquido con carbón activado. En este estudio los enjuagues con antioxidantes (ácido ascórbico y cítrico) y la adición carbón activado al medio de cultivo (500mg/l) fueron efectivos para disminuir la oxidación. Sin embargo, el uso de cloruro de mercurio en bajas concentraciones y periodos cortos de contacto con el material, mostró ser más efectivo, tanto para la desinfección como para la disminución de mini estacas oxidadas, con lo que se logró disponer de material aséptico para iniciar la siguiente fase de micropropagación.

Brotación inicial del material

Generalmente, el problema de oxidación tiende a disminuir cuando inicia el crecimiento (Amiot *et al*. 1996; Bray *et al*. 2000); sin embargo, en esta investigación se presentó nuevamente cuando las mini estacas fueron inoculadas en los diferentes medios de brotación. Por lo anterior, en los ensayos de brotación se mantuvo la incorporación de carbón activado (500mg/l) al medio de cultivo. La oxidación se puede evitar o disminuir con el cultivo de los materiales en condiciones de oscuridad y bajas temperaturas, ya que estas condiciones reducen la actividad de la fenoles (Toro, 2004). Esto se evidenció en los resultados obtenidos con las mini estacas de arándano cultivadas a 21°C, que mostraron mayores porcentajes de sobrevivencia y menor oxidación que las cultivadas a 27°C.

Las yemas de muchas especies leñosas pasan durante su ciclo anual un período de reposo, fenómeno que está asociado con la supervivencia de la especie. Los factores que inducen que las yemas entren en fase de latencia son la temperatura, longitud de los días (fotoperíodo) y las hormonas, (George 2008).

La temperatura es un factor físico que regula el crecimiento y desarrollo de las células tanto *in vitro* como *in vivo*, el control puede darse sobre las células o sobre las vías mediadas por enzimas que regulan procesos que conducen al desarrollo, (George 2008). En consecuencia, muchas especies leñosas necesitan estar expuestas a un período de frío antes de que las yemas despierten del estado de latencia. Las temperaturas más efectivas para vencer la latencia son entre 0-5°C y los períodos de frío pueden variar entre 11-42 días, aproximadamente. No obstante en esta investigación las mini estacas incubadas a 5°C en la oscuridad durante 1 y 2 semanas no mostraron la respuesta esperada a la brotación (García *et al* 2006).

La longitud del día interviene y controla la entrada en latencia de las yemas y pudo afectar la brotación de las yemas de arándano en el laboratorio, por lo que aún no se ha podido determinar el mejor tratamiento. (García *et al* 2006) mencionan que las yemas no reanudan el crecimiento inmediatamente, sino que permanecen en estado de post-latencia hasta que la temperatura aumente y se den las condiciones más templadas para el crecimiento y desarrollo de los nuevos brotes. Lo cual se evidenció cuando los brotes mostraron hinchamiento pero no la apertura completa lo que refleja una actividad renovadora de crecimiento

La latencia está regulada por la interacción entre inhibidores y promotores del crecimiento lo que pudo afectar la brotación de las yemas de arándano en el laboratorio.

Las escamas que rodean los primordios foliares evitan la desecación de las yemas, los aíslan de la pérdida de calor y restringen el movimiento de oxígeno hacia los primordios foliares, manteniendo así su actividad metabólica muy baja, en periodos de latencia (Victoriano-Mora, 2010). Por lo que una práctica que podría ser promisoría para evaluarla en siguientes ensayos de brotación sería la eliminación estas escamas.

Se ha demostrado que la orientación del explante es un factor importante que aumenta la respuesta morfogénica en arándanos (Debnath y McRae 2001). La posición horizontal presenta mayor superficie de contacto con el medio de cultivo y con la hormona contenida en el mismo, esto es evidenciado por ensayos realizados (Victoriano-Mora, 2010) que reporta una respuesta morfogénica fue más rápida, cuando los explantes de arándano se colocaron de forma horizontal comparado con la posición vertical siendo el número de brotes (81 y 63 %, respectivamente). En nuestra investigación no se observó relación entre la posición del explante en el medio de cultivo y la brotación de las yemas.

En resumen, en esta investigación se logró desarrollar una metodología de establecimiento *in vitro*, la disminución de la oxidación y la sobrevivencia de los explantes después de la fase de desinfección. Se observó hinchamiento de las yemas, como una señal de activación del crecimiento y el inicio de la apertura de las yemas, pero no se logró su apertura total. Los experimentos conducidos mostraron rutas a seguir durante la II fase de este proyecto (ya aprobado por la VIE) y reafirma que la experiencia generada por otras especies del mismo género y aún variedades, en el mismo o diferente laboratorio, no siempre se pueden aplicar de igual manera a una nueva especie bajo ensayo. Cada especie vegetal tiene sus particularidades y requerimientos para crecer y multiplicarse *in vitro*, lo que hace a la investigación una actividad retadora e interesante.

Literatura citada

- 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*. *Agronomía Costarricense* 20(1):153-175.
- Cáceres, K. 2006. Propagación *in vitro* de portainjertos de cerezo (*Prunus cerasus*). Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV). 12(14)
- Debhath, S.C. & MacRae, K. (2001). An efficient *in vitro* shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait) by axillary bud proliferation. *In vitro & Developmental Biology - Plant* 37 (2): 243-249.
- Fira, A., Clapa, D. & Badescu, C. (2008). Aspects regarding the *in vitro* propagation of Highbush Blueberry Cultivar Blue Crop. *Bulletin UASVM, Horticulture* 65: 104-109
- Frett, J.J. & Smagula, J.M. (1983). *In vitro* Lowbushblueberry. *Can. J. Plant Science* 63: 467-472.
- Galdosova, A.; Ostrolucka, M.; Libiakova, G.; Ondruskova, E.; Simala, D. 2006. Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture *in vitro*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 14: 103-119
- García, F.J; Roselló, J; Santamarina, M.P. 2006. Introducción al funcionamiento de las plantas. Editorial de la UPV. 184 p.
- George, E.; Hall, M.A.; De Klerk, G. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 1. 3 ed. Springer. Pp. 2-3.
- Guang-Jie, Z.; Zhan-Bin, W.; Dan, W. 2008. *in vitro* Propagation and *ex vitro* Rooting of Blueberry Plantlets. *Plant Tissue Culture & Biotechnology* 18: 187-195
- Hine-Gómez, A.; Abdelnour-Esquivel, A. 2013. Establecimiento *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L). *Tecnología en Marcha*. 26(4): 64-71.
- INKANATURAL. 2008. Acai : Fruto amazónico para dieta. Disponible en: www.inkanatural.com/es/arti.asp(Consultado Febrero 2012).
- INTA (Instituto Nacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos). (2011). Análisis de antioxidantes: Qué y cómo se deben medir. Consultado 25 octubre 2011. Disponible en <http://portalantioxidantes.com/analisis-de-antioxidantes/>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.
- Jiménez-Bonilla, V.; Abdelnour-Esquivel, A. 2013. Identificación y valor nutricional de algunos materiales nativos de arándano (*Vaccinium* spp). *Tecnología en Marcha* 26(2): 38

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/ECUENTROS26/reacciones.html>>

Madriz J.P. 1999. Vaccinium: Especies silvestres neotropicales, perspectivas para la domesticación de nuevos frutales arbustivos, en los bosques montanos del neotrópico. Memorias IX Congreso Nacional Agronómico. P. 295.

Méndez-Álvarez, D.; Abdelnour-Esquivel, A. 2014. Revista Forestal Mesoamericana Kurú (Costa Rica), 11(27):7-21.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497.

Niubó, E; Díaz, P; Oliva, O; Portieles, R; Díaz, A; Ancheta, O; Rodríguez, S; Soto, A; Cecilia, S. 2004. Metodología para la obtención *in vitro* de plantas y tejidos de la caña de azúcar libre de contaminantes exófilos endófitos. *Ciencias Biológicas*. Vol 35 (3): 155-161. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181225915004>

Ostrolucka, M.; Gajdosova, A.; Libiakova, G.; Hrubikova, K; Bezo, M. 2007. Protocol for micropropagation of selected Vaccinium spp. In: Jain, S.M; Haggman, H. (ed.) *Protocols for micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer. Pp. 445-455

Plata, M.I. 2002. Micropropagación de arándanos. En: <http://www.inta.gov.ar/concordia/info/documentos/Fructicultura/T-Micro-arándano>. (Consultado 26/04/2010)

PROCOMER. 2012. En: <http://servicios.procomer.go.cr/estadisticas/inicio.aspx> (Consultado 28/03/2012)

Rathore, J., M.S. Rathore, M. Singh, M. Singh, R.P. Singh y N.S. Shekhawat. 2007. Micropropagation of mature tree of Citrus limon. Consultado 23 de Septiembre de 2014. Disponible en <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5026/1/IJBT%206%28%29%20239-244.pdf>

Rache Cardenal L.; Pacheco J. Propagación *in vitro* de plantas adultas de Vaccinium meridionale (Ericaceae). *Acta Bot. Bras.* [serial on the Internet]. 2010 Dec [cited 2012 Apr 17]; 24(4): 1086-1095. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062010000400024&lng=en.

Reed, B.M.; Abdelnour-Esquivel, A. 1991. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of Vaccinium species. *HortScience* 26: 1320-1322.

Ross, S.; Castillo, A. 2009. Mass propagation of *Vaccinium corymbosum* in bioreactors. *Agrociencia* 13(2):1-8.

Toro.2004. Establecimiento de protocolos para para regeneración *in vitro* de cerezo dulce (*Prunus avium*)var .Lambert. Universidad Católica de Temuco. Chile. Disponible en:< <http://www.Uct.cl./tesis-online/Margarita-To/tesis.pdf>>

Trevisan, R.; Franzon, R.C.; Neto, R.F.; Da Silva Goncalves, R.; Dias Goncalves, E.; Correa Antunes, L.E. 2008. Enraizamiento de estacas herbáceas de mirtilo. *Ciencia e Agrotecnologia*. 32(2):1-6 Lavras (En línea). Marzo-Abril.

Victoriano Mora, H. (2010). Organigesis *in vitro* de Arándano (*Vaccinium corymbosum* L). Tesis de Magister en Ciencias en Producción Agrícolas Sustentable. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral. Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Mich. Chile.