

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
Micropropagación de árandano azul (*Vaccinium corymbosum* L.):
Revisión de literatura

Estudiante

José Daniel Guerrero Cazar

Asesoras

María Alexandra Bravo, M.Sc.

Alejandra Sierra Augustinus, M.Sc.

Honduras, agosto 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ROGEL CASTILLO

Director Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Contenido.....	3
Índice de Cuadros.....	5
Resumen	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Metodología.....	10
Revisión de Literatura	11
Variedades	11
Necesidades del Cultivo	12
Propagación Convencional.....	13
Micropropagación.....	14
Material Vegetal	14
Desinfección Material Vegetal.....	15
Medio de cultivo	17
Reguladores de Crecimiento.....	21
Citoquininas	21
Enraizamiento y Aclimatación	21
Conclusiones	23

Recomendaciones..... 24

Referencias..... 25

Índice de Cuadros

Cuadro 1_ Variedades comerciales de arándano clasificadas por su tiempo a cosecha	12
Cuadro 2_ Variedades de arándano estudiadas para micropropagación	15
Cuadro 3_ Protocolos de desinfección de microestacas de arándano para su establecimiento in vitro	16
Cuadro 4_ Medio de cultivo de Lloy y McCown WPM (Woody Plant medium).....	19
Cuadro 5_ Medio Anderson Rhododendron	20

Resumen

El arandano azul (*Vaccinium corymbosum* L.), es un arbusto frutal perteneciente a la familia Ericaceae, es uno de los cultivos más importantes del tipo bayas y en el género *Vaccinium*. El arándano no es un cultivo convencional, pues la necesidad de producción los llevó a crear distintos métodos de propagación desde los comunes como por estacas e injertos, por otro lado, el cultivo in vitro es una gran opción para la propagación, asegurándonos una reproducción sana y muy eficiente. El objetivo de esta revisión de literatura fue conocer el estado actual de la micropropagación de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) para el posterior desarrollo de un protocolo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de Zamorano. La revisión se realizó entre febrero y abril del 2021, la información se obtuvo de las bases de datos: Springer Link, Scielo, reserchgate, Google scholar, FAO. El medio más usado para su propagación in vitro es el de Anderson suplementado con zeatina y 2ip en la etapa de multiplicación y con IBA y carbón activado en la etapa de enraizamiento.

Palabras clave: citoquininas, micropropagación, arándano, medio.

Abstract

The blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.), is a fruit shrub belonging to the Ericaceae family, it is one of the most important crops of the berry type and in the *Vaccinium* genus. Blueberry is not a conventional crop, as the need for production led them to create different propagation methods from the common ones such as cuttings and grafts, on the other hand, in vitro culture is a great option for propagation, ensuring healthy reproduction. and very efficient. The objective of this literature review was to know the current state of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) micropropagation for the subsequent development of a protocol in the Zamorano Plant Tissue Culture Laboratory. The review was carried out between February and April 2021, the information was obtained from the databases: Springer Link, Scielo, reserchgate, Google scholar, FAO. The most widely used medium for its in vitro propagation is Anderson's medium supplemented with zeatin and 2ip in the multiplication stage and with IBA and activated carbon in the rooting stage.

Keywords: cytokinins, micropropagation, blueberry, medium.

Introducción

El arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.) es uno de los cultivos más importantes del tipo bayas y el más importante en el género *Vaccinium*, por su gran cantidad de nutrientes útiles para la salud de sus consumidores, llevado tanto vitaminas como minerales, también presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales. Estos factores y su sabor único han aumentado el interés de su producción y consumo (García et al. 2018)

El arándano es una planta del tipo arbusto que puede llegar a medir 1.5 m por esto lleva el nombre en inglés de "Highbush blueberry". Fue descubierto en el hemisferio norte, especialmente en Estados Unidos de América, es desarrollada y domesticada para su producción desde arbustos silvestres encontrados en las montañas, siendo esta la especie más cultivada a nivel mundial del género *vaccinum*. Los líderes en producción de arándanos son EEUU y Canadá con 223000 toneladas, en alrededor de 44000 hectáreas, seguidos por Chile en segundo lugar con 13000 toneladas. Conforme pasan los años la producción arándano va aumentando por la creciente demanda que existe en los mercados mundiales (García et al. 2013).

El arándano no es un cultivo convencional, pues la necesidad de producción llevó a crear distintos métodos de propagación, entre los que tenemos, la propagación por injertos y porta injertos; siendo esta una forma muy compleja de propagar que requiere mucha experiencia, contando con pocas personas e instituciones en el mundo que se dedican a este proceso. Otro método de propagación es por estacas que principalmente se realiza en viveros, este método consta del uso de material vegetal en madera dura de hace un año o en madera verde, retirados al momento de realizar la poda, pero se recomienda el uso de plantas madre mantenidas con esta finalidad y no plantas de campo para conservar un ambiente libre de patógenos y enfermedades.

La propagación por injerto es sumamente difícil por la biología de la planta y su capacidad de crecer desde su base en las raíces, solo utilizado para el cambio de variedad en un cultivo ya preparado (García J et al. 2018). Los métodos de propagación comunes, aunque efectivos, no son

suficientemente eficientes, pues juegan un papel muy importante las condiciones de la planta madre, su edad, estación de crecimiento y crea pocos resultados en cuanto a eficiencia. El cultivo *in vitro* es una gran opción para la propagación de arándano, asegurándonos la propagación de plantas sanas y muy eficiente en cuanto a número de propágulos conservando la genética por varias generaciones (Ostrolucká *et al.* 2009).

El objetivo de esta revisión de literatura fue conocer el estado actual de la micropropagación de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) para el posterior desarrollo de un protocolo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de Zamorano.

Metodología

Se realizó una revisión sistemática de documentos de sociedades científicas dedicadas al avance científico agronómico. También se consultaron revisiones sistemáticas y estudios científicos sobre la micropropagación de arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.) en las bases de datos disponibles en la Biblioteca Wilson Popenoe de Zamorano con acceso libre y por suscripción.

Las bases de datos de acceso libre utilizadas son: Researchgate, Scielo, FAO, Cepal, Google scholar y Serida. Las bases de suscripción usadas fueron: Agora, Elibro, Springer y Teeal. Como criterios de búsqueda usaron las siguientes palabras en español e inglés: blueberry *in vitro*, blueberry micropropagation, blueberry propagation, Highbush Blueberry, Arandano alto, propagación de arándanos, estado general de arándano, Protocols for *in vitro* micropropagation. Como palabras que se decidió descartar a la hora de la búsqueda está, hormones in blueberry esta búsqueda nos daba investigaciones sobre el valor nutricional del fruto y no sobre su propagación.

Revisión de Literatura

Vaccinum es uno de los géneros más grandes de la familia Ericaceae con 450 especies distribuidas por el hemisferio norte, básicamente por Norteamérica, Europa Central y Eurasia (Asturizaga *et al.* 2006). La domesticación del arándano “highbush” inicia a finales del siglo XIX y a principios del siglo XX iniciada la domesticación de este arbusto en Norteamérica y actualmente EEUU es uno de los mayores productores a nivel mundial con una producción del 90%, seguido por Canadá y Alemania, en América del sur, Chile es el mayor productor con una producción del 90% en este continente (García *et al.* 2013)

En cuanto a la botánica, el arándano azul es un arbusto que puede llegar a crecer en condiciones alrededor de 2.5 metros de alto. Desde el punto de vista de morfología, su raíz que es superficial encontrándose en los primeros 40 cm, con raíces fibrosas y finas, hojas de 5 cm de longitud de color verde pálido, flores axilares o terminales del tipo campana, de color blanco con cinco pétalos; en cuanto al fruto, tenemos una baya esférica de 1 a 3 cm de diámetro, pesando entre 0.5 a 4.0 gr, con un color negro azulado al terminar la maduración (García y García 2015)

Variedades

Claramente la selección de una variedad va a depender del productor, que va debe basarse en la zona que va a ser cultivado dependiendo de sus climas y las horas de frío necesarias para que la planta pueda desarrollarse por completo. También va a depender del mercado y sus exigencias. Las variedades se clasifican por distintas características como por su época de cosecha siendo este temprano seis meses, media estación con ocho meses y tardía 10 meses (Cuadro 1).

Cuadro 1

Variedades comerciales de arándano clasificadas por su tiempo a cosecha

Tiempo de cosecha	Variedad	Características
Temprana	Duke	Produce ramas desde el suelo, fruto grande y crocante al masticar, tiene una floración tardía.
	Legacy	Crece de forma vertical abierto, muy productivo, de frutos medianos y con gran sabor.
	Bluecrop	Superproductivo con un cultivo de gran tamaño y sabor, crece de forma erecta desde la base.
Media estación	Brigitta	Crecimiento ligeramente abierto y muy productivo con frutos grandes, pero ligeramente ácidos, mejore con la polinización cruzada.
	Ozarkblue	Crecimiento vertical y vigoroso, recomendado para zonas con largos invierno y muy fríos, fruto de mucha calidad.
	Liberty	Es un cruce entre Brigitta y Elliotte heredando sus características, abierto y vigoroso con un fruto muy firme con sabor acidulado
Tardía	Elliot	De vigor medio, con sabor ácido. Necesita podas fuertes en el primer año, para poder formar bien como arbusto.
	Aurora	Vigoroso con un fruto de gran calidad, pero es de los arbustos más tardíos (entre 5 y 10 años).

Nota. Tomado de (García JCarlos y García G 2015).

Necesidades del Cultivo

Vaccinium corymbosum L. es un cultivo perenne, para su desarrollo es necesario contar con un clima frío con temperaturas de 7°C para acumular entre 400 y 600 horas de frío. En cuanto a las necesidades pedológicas, el suelo debe encontrarse en condiciones ácidas con un pH de 5 a 6.2, se recomienda acidificar con azufre tres meses antes de que se coloque el cultivo y de ahí mantener el suelo acidificado mediante el riego con fertilizantes sulfatados (Forbes *et al.* 2009). Es recomendable su siembra en camellones de 0.3 a 0.5 m de alto y preferentemente de 1 m de ancho para evitar problemas de encharcamiento. Todo esto debe ir complementado con el mulching y con un buen

sistema de riego. El más recomendable es el riego por goteo, el cual va a cubrir las necesidades hídricas del cultivo y suministrar fertilizante, para su correcto desarrollo (García 2011).

Propagación Convencional

Para implementar un cultivo se debe encontrar el material genético que cumpla las exigencias del mercado y una vez seleccionada la variedad para iniciar nuestro cultivo necesitamos plántulas. Comúnmente tenemos dos maneras de propagación, sexual por semillas, o la forma asexual que es a través de material vegetal por estacas y micropropagación. La propagación por semillas es utilizada para la investigación y la creación de nuevas variedades, mas no para el comercio y producción a gran escala (Infoagro 2011).

En cuanto a la propagación por material vegetativo se usan estacas e injertos. Para realizar estas prácticas se necesita material de buena calidad y que sea libre de patógenos que a la larga pueda darnos un resultado no deseado, como plántulas débiles y con un bajo rendimiento. Sobre la propagación por estacas se recomienda el uso de material de madera dura, ya que su manejo es más sencillo que el material más nuevo y blando, este parece más rápido a comparación con el de madera dura, pero puede enraizar y estar listo en menor tiempo (Schulte y Hancock 1983)

Para el proceso de propagación por estacas se utilizan estaquillas de 10 a 12 cm de las cuales se elimina las yemas de las flores ya que estas inhiben el enraizamiento. Estas se sumergen en una solución fungicida para evitar problemas de contaminación, para luego ser llevadas a un refrigerador por 15 días a 7 - 8 °C. En este punto las estacas son tratadas con soluciones enraizantes que contienen ácido indolbutírico (IBA) 500 mg/L en la base, las estacas son colocadas en sustratos con turba y perlita dentro de micro túneles bien ventilados, siendo acompañadas con riego, hasta ser enraizadas, finalmente, después de 6 - 8 meses se encuentran aptas para ser llevadas al campo (García J et al. 2018).

La implementación de la técnica de injertos en la producción de arándanos es usada principalmente para cambiar de variedades, esta práctica surge para mejorar la plantación, para así

poder cumplir con las exigencias del mercado, mayor calidad, sabor, tamaño y condición de la fruta para poder competir en más mercados. Pero no es solo para mejorar la fruta, sino también el desarrollo del cultivo, cambiando a variedades más resistentes a plagas o necesidades hídricas o en suelos no muy aptos para su producción (Carrillo 2019).

Micropropagación

La micropropagación es la propagación vegetativa a través del uso de técnicas de cultivo *in vitro*, el término hace referencia a la cantidad de material vegetal utilizado para iniciar un cultivo, los explantes pueden ser yemas, meristemas o domos meristemáticos, que comparados con las estacas usadas en la macropropagación son de un tamaño considerablemente menor (Castillo Cano 2013).

Esta técnica es muy utilizada en la producción de plántulas de arándano, ya que comparada a las demás técnicas es más eficiente, además las plántulas tienen un hábito de crecimiento más tupido, con mayor brotación lateral, desarrollo de corona y cantidad de yemas florales por planta, lo que se traduce en mayor cantidad de frutos y rendimiento, aunque pueden existir diferencias entre cultivares (Brenes *et al.* 2015).

Para la correcta implementación de un sistema de propagación *in vitro* de arándano, se debe crear un protocolo de que debe ser desarrollado mediante una investigación previa empezando desde su establecimiento *in vitro* con la selección del material vegetal, desinfección de este material, medio de cultivo, reguladores de crecimiento, sustratos y condiciones para su aclimatación *ex vitro*, evaluando los resultados y rendimientos obtenidos en cada etapa.

Material Vegetal

El explante es una parte del tejido u órgano que con fines de cultivo es aislado del resto de la planta. La selección de un explante es el primer paso para establecer cultivos. Este puede ser un fragmento cualquiera de la planta madre, sin embargo, esta planta debe cumplir ciertas características que la clasifiquen como la mejor para ser propagada masivamente. Se debe elegir un explante adecuado para establecer el cultivo *in vitro*. Los explantes más frecuentemente utilizados son las

microestacas (Ostrolucká et al. 2009; Sedlak y Paprstein 2009; Mihaljević y Salopek-Sondi 2012; Ružić et al. 2012; Brenes et al. 2015; Huh YSun et al. 2015; Clapa et al. 2018). En el Cuadro 2 se presentan las variedades estudiadas por los investigadores para su micropropagación.

Cuadro 2

Variedades de arándano estudiadas para micropropagación

Variedad	Referencias
Berkeley	Ostrolucká et al. (2009); Sedlak y Paprstein (2009); Ružić et al. (2012)
Bluecrop	(Ostrolucká et al. (2009); Sedlak y Paprstein (2009); Mihaljević y Salopek-Sondi 2012; Ružić et al. (2012) Sedlak y Paprstein (2009)
Blueray	(Ostrolucká et al. (2009); Clapa et al. (2018)
Duke	Ostrolucká et al. (2009); Clapa et al. (2018)
Brigitta	Ostrolucká et al. (2009)
Goldtraube'	Ružić et al. (2012)
Jersey	Mihaljević y Salopek-Sondi (2012)
Burlington	Mihaljević y Salopek-Sondi (2012)
Spartan	Sedlak y Paprstein (2009); Huh YSun et al. (2015)
Bonita	Brenes et al. (2015)
Delite	Brenes et al. (2015)
Woodard	Brenes et al. (2015); Huh YSun et al. (2015)
Northland	Huh YSun et al. (2015)

Desinfección Material Vegetal

Normalmente las plantas se encuentran infectadas con patógenos que comúnmente y en condiciones de producción en campo no suelen presentar un problema. En condiciones de cultivo *in vitro* si presentan un problema contaminando y limitando el desarrollo celular. Por los organismos contaminantes es necesario seguir un procedimiento de desinfección superficial previo a la siembra del material vegetal, para eliminar los posibles fallos por un explante contaminado (Martínez 2014). Para este proceso tenemos como referencia a Brenes *et al.* (2015), que realizaron la desinfección superficial con agua potable por 30 minutos, seguido por la inmersión en alcohol de 70% en agitación constante durante 1 minuto, y luego por inmersión en una solución NaOCl al 3% (volumen/volumen)

con una gota de Tween 20, y agitación durante 10 minutos. Luego, en la cámara de flujo laminar, realizaron tres enjuagues consecutivos con agua desionizada estéril durante dos minutos cada uno. Este procedimiento lo realizan varios autores con diferentes productos, tiempos y concentraciones (Cuadro 3).

Cuadro 3

Protocolos de desinfección de microestacas de arándano para su establecimiento in vitro

Fuentes	Ethanol 70% segundos	NaOCl % ingrediente activo	Minutos en NaOCl	Agua destilada estéril
(Vescan et al. 2012)	No realizado	1.0	20	15 minutos
(Brenes et al. 2015)	60	3.0	10	2 minutos
(Fan et al. 2017)	10	1.2	20	10 segundos
(Sedlak y Paprstein 2009)	120	20.0 %v/v	15	10 segundos
(Eccher y Noe 1989)	No realizado	0.6	15	10 minutos

Siembra o Establecimiento *in vitro*

De acuerdo con la investigación realizada por Rodríguez y Morales (2015), la siembra se realiza dentro de una cámara de flujo laminar (ESCO AHC-5A1) en frascos de 200 mL, cubiertos con papel aluminio y sellados con parafilm. Los explantes se incubaron por 45 días a 25 ± 3 °C, con fotoperíodos de 16 horas luz y una intensidad lumínica de 3000 lux. En el estudio evaluaron el número de explantes desarrollados de acuerdo con el volumen y demostraron que el desarrollo de los explantes va fielmente relacionado a la cantidad de medio. Dando como resultados que en la variedad Brigitta se obtuvieron brotes más largos trabajando con densidades y volúmenes elevados, y en la variedad Legacy lograron obtener brotes más largos en el experimento con densidades de 15 explantes por frasco con 30 y 40 mL de medio.

Medio de cultivo

En la micropropagación se utilizan una gran cantidad de medios de cultivos, los cuales se adaptan a las necesidades del cultivo. Estos medios son colocados en contenedores, los cuales en su mayoría son de vidrio y son esterilizados para que se elimine la probabilidad contaminación. Entre los medios más usados están los semisólidos, aunque la investigación va avanzando podemos observar medios líquidos en biorreactores en los cuales la tasa de multiplicación aumenta considerablemente (Ross y Castillo 2007)

Antes de realizar la desinfección del material vegetal que se va a introducir *in vitro*, es necesario disponer de medios de cultivo esterilizados y dosificados en recipientes adecuados. (Yparraguirre y Muzaurieta 2020). Los trabajos de micropropagación en arándano son realizados en su mayoría en medio de cultivo Lloyd y McCown (1981) también conocido como medio WPM por sus siglas en inglés (Woody Plant Medium) (Cuadro 4). Según la investigación realizada por Aquije Valiente (2020), es el mejor medio para la micropropagación de arándano variedad Biloxi. Para la formulación del medio WPM en etapa de multiplicación se utiliza sacarosa 20 g/L, , tiamina 1 mg/L, glicina 1 mg/L, piridoxina 0.5 mg/L, ácido nicotínico 0.5 mg/L, Inositol 100 mg/L y con un pH de 3.50 - 4.50 y 8 g/L de Agar (Himedia 2015b). Las vitaminas son muy importantes para el desarrollo *in vitro*. La tiamina generalmente se la utiliza en una mayor cantidad, debido a su importancia en el metabolismo celular que permite darle un buen crecimiento a la planta, y resulta adecuada para la inducción de callos (Galan et al. 2018)

Si bien los estudios demuestran que el medio WPM es muy bueno para la proliferación de este cultivo también se ha llegado a utilizar con fines de investigación los medios de Murashige y Skoog (MS) y el medio Anderson Rhododendron (AN) (Cuadro 5). Estos dos han sido comparados, dándonos como resultado que el medio MS no es útil en la propagación de arándanos, debido a su baja capacidad de multiplicación de brotes, por otro lado, el medio AN nos muestra una mayor tasa de multiplicación cuando se le agrega zeatina (Ružić *et al.* 2012).

Como fuente de carbohidratos se utiliza comúnmente la sacarosa en concentraciones entre el 20 a 30 g/L, esta nos ayuda a mantener la viabilidad de las plantas por su contenido alto de carbohidratos. La sacarosa en los cultivos *in vitro* de arándanos, se ve relacionado con los números de brotes obtenidos de acuerdo con Cao *et al.* (2003), nos dicen que el nivel de sacarosa para una correcta proliferación de brotes está entre 6-10 g/L, pero también una amplia cantidad de sacarosa da resultados negativos en cuanto a la propagación, con 20.54 g/L las plantas o mueren o no se desarrollan correctamente.

Cuadro 4*Medio de cultivo de Lloy y McCown WPM (Woody Plant medium)*

Componentes	Formula	Nombre	mg/L
Macroelementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	400,000
	CaCl ₂	Cloruro de calcio	72,500
	CaH ₂ N ₂ O ₇	Nitrato de calcio monohidrato	386,340
	MgSO ₄	Sulfato de magnesio	180,690
	KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico	170,000
	K ₂ SO ₄	Sulfato de potasio	990,000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido trixobórico	6,200
	CuSO ₄	Sulfato de cobre pentahidratado	0,025
		EDTA ácido etilendiaminotetraacético	
	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈		37,300
	FeH ₁₄ O ₁₁ S	Sulfato de hierro heptahidrato	27,800
	MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de magnesio monohidrato	22,300
	MoO ₃ .H ₂ O	Óxido de molibdeno (sodium salt)	0,213
H ₁₄ O ₁₁ SZn	Sulfato de zinc heptahidrato	8,600	
Vitaminas		Inositol	100
		Ácido Nicotínico	0,5
		Pyridoxina HCl	0,5
		Tiamina	1
Aminoácidos		Glicina	2
Reguladores		Zeatina	0.50 – 2.0
	CITOQUININA	2-iP-ribosida	2.5 – 5.0
		2-iP	2.5 – 5.0
	AUXINA	IBA	0.2 – 0.5
Carbohidratos:		Sacarosa	20.000

Nota. Tomado de (Himedia 2015b)

Cuadro 5.*Medio Anderson Rhododendron*

Componentes	Formula	Nombre	mg/L
Macroelementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	400,000
	CaCl ₂	Cloruro de calcio	332,000
	MgSO ₄	Sulfato de magnesio	180,690
	NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sodio monobásico	330,390
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido trioxoborico	6,200
	CoCl ₂	Cloruro de cobalto	0,025
	CuSO ₄	Sulfato de cobre pentahidratado	0,025
	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	EDTA ácido etilendiaminotetraacético	74,500
	FeH ₁₄ O ₁₁ S	Sulfato de hierro heptahidrato	55,700
	MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de magnesio monohidrato	16,900
	MoO ₃ .H ₂ O	ácido de molibdeno (sodium salt)	0,213
	H ₁₄ O ₁₁ SZn	Sulfato de zinc heptahidrato	8,600
Vitaminas		Yoduro de potasio	0,300
		Inositol	100
		Tiamina	0
Gelificante		CleriGel™	3000
Reguladores		Zeatin	0.5.0 – 2.0
	CITOQUININA	2-iP-riboside	2.5 – 5.0
		2-iP	2.5 – 5.0
Carbohidratos:	AUXINA	IBA	0.2 – 0.5
		Sucrose	30.000

Nota. Tomado de (Himedia 2015a)

Fan et al. (2017) probaron tres tipos de medios de cultivo, MS, WPM y AN con la variedad Bluejay; en el cual coincidieron con el trabajo de Ružić *et al.* (2012), donde comprueban que el medio Anderson es mejor en el momento de multiplicación y posteriormente enraizamiento. El éxito del medio Anderson podría estar relacionado con la composición mineral del medio. Las plantas de la familia Ericácea tienen raíces pilosas (Valenzuela et al. 2008), siendo autóctonas de suelos con pH bajo y bajo contenido de nutrientes por lo tanto, el contenido de nutrientes minerales en este grupo de plantas como el arándano son generalmente bajos correspondiendo con Nas y Read (2004), que

en su trabajo manifiestan que un medio de cultivo para una especie en particular debería parecerse a la composición de su semilla.

Reguladores de Crecimiento

Citoquininas

Encontradas por primera vez en el año de 1956 por el grupo de Skoog que aisló la quitina de la esperma de arenque en una autoclave (Skoog *et al.* 1956). Pero la primera citoquinina de origen natural fue aislada por los grupos de Letham en 1963, en semillas inmaduras de maíz dándole el nombre de zeatina. Las citoquininas han pasado varias décadas para que sea uno de los grupos de hormonas más conocidos de las plantas. Los primeros estudios fueron desde la aplicación de hormonas de forma exógena para observar su efecto sobre las plantas, hasta la actualidad de crear plantas transgénicas que llevan alterado su contenido de citocinas para favorecer su división vegetal (Segura 2008).

De acuerdo con el trabajo de Borsai *et al.* (2019), el uso de un medio WPM suplementado con 5 mg/L de Zip nos da como resultado un mayor promedio de proliferación en la variedad Patriot comprado con la zeatina, aunque el número de brotes por explante es similar para la concentración de 0.5 mg/L de zeatina en la variedad Duke y Blueray. Los resultados del estudio también dependen de las variedades que se van a utilizar, zeatina trabaja mejor en la variedad Blueray y Duke con 4.38 brotes por explante, por otro lado, Zip trabaja mejor en la variedad Patriot con 5.06 brotes por explante.

Enraizamiento y Aclimatación

El enraizamiento al igual que la aclimatación son fases sumamente importantes para obtener al final una planta viable y que pueda sobrevivir en campo. Después de la fase de multiplicación, se llevan los brotes obtenidos a un nuevo medio suplementado con auxinas para iniciar su proceso de enraizamiento. El medio de cultivo en el momento de enraizamiento suele ser el mismo de la multiplicación reemplazando las citoquininas por auxinas y en ocasiones se utiliza carbón activado, ya que tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, ya que tiene la capacidad de atrapar

diferentes tipos de moléculas, sustancias en exceso, entre estos los inhibidores de crecimiento. Ostrolucká *et al.* (2009), en la fase de enraizamiento utilizan el medio Anderson con concentración de 0.8 mg/L IBA y 0.8 g/L de carbón activado; dando un resultado del 95% de enraizamiento en la variedad Berkeley. Posteriormente, las plántulas son llevadas a invernaderos para su aclimatación, por dos semanas con riego constante y protegidas de la luz con malla para luego ser destapadas, para continuar con su desarrollo. Después de dos meses obtuvieron plantas de 12 cm, las cuales fueron trasplantadas en campo con un resultado final de 80-90% de supervivencia desde el enraizamiento.

Meiners *et al.* (2007) trabajando con *Vaccinium vitis-idaea* y *V. corymbosum* variedades Red Pearl y Ozarkblue, utilizaron en enraizamiento el medio WPM el cual fue suplementado con sacarosa al 20 g/L y AIB (ácido indolbutírico). Obteniendo con AIB un 93% de enraizamiento en Ozarkblue y un 76% en Red Pearl. En cuanto al proceso de aclimatación se reporta con éxito el uso de turba, arena y perlita (4: 2: 1), pH 4.5–5 y manteniendo alta humedad.

Conclusiones

La micropropagación de arándano ha contribuido a la propagación masiva de plántulas sanas y con la calidad necesaria para incorporarlas a un sistema de producción.

En la etapa de establecimiento se debe usar medio WPM y en las etapas de multiplicación y enraizamiento el medio Anderson Rhododendron.

El uso de 2iP en las etapas de establecimiento y multiplicación favorece la proliferación de brotes; y el AIB + carbón activado favorecen la formación de raíces.

Recomendaciones

Se recomienda la investigación en el uso de meristemas como explantes.

Se recomienda investigar el uso biorreactores o sistemas de inmersión temporal para la micropropagación de arándanos.

Referencias

- Aquije Valiente JP. 2020. Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) -variedad Biloxi [Tesis]. Tegucigalpa, Honduras: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 22 p; [consultado el 24 de mar. de 2021]. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/6832>.
- Asturizaga AS, Øllgaard B, Balslev H. 2006. Frutos comestibles. En: Moraes m, Øllgaard, B, Balslev H, Borchsenius F, Kvist P, editores. Botánica Económica de los Andes Centrales. Cochabamba, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés. p. 329–346. <https://beisa.au.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdf/Capitulo%2021.pdf>.
- Borsai O, Hârța M, Pamfil D, Clapa D. 2019. The effect of cytokinins on micropropagation success of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). AgroTransilvania Cluster. (3-4):93–100. doi:10.15835/agrisp.v11i3-4.13546.
- Brenes AA, Castillo MR, Gómez-Alpízar L. 2015. Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (*Vaccinium spp.*) a partir de segmentos foliares de dos procedencias. Agronomía Costarricense. 39(1):7–23. doi:10.15517/rac.v39i1.19541.
- Cao X, Fordham I, Douglass L, Hammerschlag F. 2003. Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves † from in vitro propagated highbush blueberry shoots. Plant Cell Tiss Organ Cult. 75(3):255–259. doi:10.1023/A:1025856404937.
- Carrillo M. 2019. El injerto en arándanos, una alternativa rápida para el cambio varietal. Santiago de Chile: Blueberries Consulting; [consultado el 2 de mar. de 2021]. <https://blueberriesconsulting.com/el-injerto-en-arandanos-una-alternativa-rapida-para-el-cambio-varietal/>.
- Castillo Cano M. 2013. Aplicación de la micropropagación y criopreservación a la conservación *ex situ* de especies vegetales de interés [Tesis doctoral]. Alicante: Universidad de Alicante; [consultado el 2 de mar. de 2021]. https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/35678/1/Tesis_Cano_Castillo.pdf.

- Clapa D, Bunea C, Borsai O, Pintea A, Hârța M, Ștefan R, Fira A. 2018. The Role of Sequestrene 138 in Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Micropropagation. HortScience. 53(10):1487–1493. doi:10.21273/HORTSCI13269-18.
- Eccher T, Noe N. 1989. Comparison between 2ip and zeatin in the micropropagation of highbush blueberry (*vaccinium corymbosum*). Acta Horticulturae. (241):185–190. doi:10.17660/ActaHortic.1989.241.29.
- Fan S, Jian D, Wei X, Chen J, Beeson RC, Zhou Z, Wang X. 2017. Micropropagation of blueberry ‘Bluejay’ and ‘Pink Lemonade’ through in vitro shoot culture. Scientia Horticulturae. 226:277–284. doi:10.1016/j.scienta.2017.08.052.
- Forbes P, Mangas E, Pagano N. 2009. Producción de Arandanos. Santa Rosa, Argentina: Universidad Nacional de La Pampa. 67 p. <http://www.agro.unlpam.edu.ar/licenciatura/disenio/producciondearandanos.pdf>.
- Galan V, Rangel A, Lopez J, Hernandez JBP, Sandoval J, Rocha HS. 2018. Propagación del banano: técnicas tradicionales, nuevas tecnologías e innovaciones. Revista Brasileira de Fruticultura. 40(4). doi:10.1590/0100-29452018574.
- García J, García G, Ciordia AM. 2018. El cultivo del arándano en el norte de España. 1ª ed. Asturias: SERIDA. 194 p.
- García JC. 2011. El cultivo del arándano en Asturias. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Tecnología Agroalimentaria, SERIDA; [consultado el 18 de mar. de 2021]. 9:13–20. <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4815>.
- García JC, García G. 2015. Orientación Para El Cultivo Del Arándano. 1ª ed. Asturias.
- García JC, González G, Ciordia AM. 2013. Situación actual del cultivo. Tecnología Agroalimentaria; [consultado el 2 de mar. de 2021]. 12(12):5–8. <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=5566>.

- Himedia. 2015a. Anderson rhododendron medium. Mumbai, India: Himedialabs; [actualizado el 2 de abr. de 2021; consultado el 2 de abr. de 2021]. 2 p. <https://himedialabs.com/TD/PT019G.pdf>.
- Himedia. 2015b. Woody plant medium. Mumbai, India: Himedialabs; [actualizado el 24 de mar. de 2021; consultado el 24 de mar. de 2021]. 2 p. <https://himedialabs.com/TD/PT105.pdf>.
- Huh YS, Lee JK, Kim IJ, Kang BG, Lee KY. 2015. Effect of biocide addition on plantlet growth and contamination occurrence during the in vitro culture of blueberry. *Journal of Plant Biotechnology*. 42(2):111–116. doi:10.5010/JPB.2015.42.2.111.
- Infoagro. 2011. Cultivo de Arandano. Infoagro. Mexico: Infoagro; [actualizado el 2 de mar. de 2021; consultado el 2 de mar. de 2021]. www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_arandano.asp.
- Letham DS. 1963. Zeatin, a factor inducing cell division isolated from. *Life Sciences*. 2(8):569–573. doi:10.1016/0024-3205(63)90108-5.
- Martínez NR. 2014. Establecimiento in vitro de café *(Coffea arabica)* variedad cuscatleco por medio de microesquejes [Tesis]. El Salvador: Universidad De el Salvador. 61 p; [consultado el 23 de mar. de 2021]. <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/13735/>.
- Meiners J, Schwab M, Szankowski I. 2007. Efficient in vitro regeneration systems for *Vaccinium species*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 89(2-3):169–176. doi:10.1007/s11240-007-9230-7.
- Mihaljević S, Salopek-Sondi B. 2012. Alanine conjugate of indole-3-butyric acid improves rooting of highbush blueberries. *Plant, Soil and Environment*. 58(5):236–241. doi:10.17221/34/2012-PSE.
- Nas MN, Read PE. 2004. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. *Scientia Horticulturae*. 101(1-2):189–200. doi:10.1016/j.scienta.2003.10.004.
- Ostrolucká M, Gajdošová A, Ondrušková E, Libiaková G. 2009. *In vitro* propagation of *Vaccinium species*. Latvia University; [consultado el 6 de mar. de 2021]. 676(426):207–212. <http://eeb.lu.lv/EEB/2004/Ostrolucka.pdf>.

- Rodríguez BM, Morales UD. 2015. Effect of explant density and volume of cultivation medium on *in vitro* multiplication of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) varieties "Brigitta" and "Legacy". *Scientia Agropecuaria*. 6(1):31–40. doi:10.17268/sci.agropecu.2015.01.03.
- Ross S, Castillo A. 2007. Evaluación de biorreactores para propagación clonal *in vitro* de *Vaccinium corymbosum*. Montevideo, Uruguay.
- Ružić D, Vujović T, Libiakova G, Cerović R, Gajdošova A. 2012. Micropropagation *in vitro* of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Berry Research*. 2(2):97–103. doi:10.3233/JBR-2012-030.
- Schulte N, Hancock J. 1983. Propagating highbush blueberries. [sin lugar]: Michigan State University; [consultado el 24 de mar. de 2021]. *Extension Bulletin*. [https://www.canr.msu.edu/uploads/resources/pdfs/propagating_highbush_blueberries_\(e1680\).pdf](https://www.canr.msu.edu/uploads/resources/pdfs/propagating_highbush_blueberries_(e1680).pdf).
- Sedlak J, Paprstein F. 2009. *In vitro* multiplication of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *Acta Horticulturae*. (810):575–580. doi:10.17660/ActaHortic.2009.810.76.
- Segura J. 2008. Citoquininas. En: Azcon Bieto J, Talon M, editores. *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2ª ed. Madrid: McGraw-hill-Interamericana; Universitat de Barcelona. 421-442. <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FundamentosdeFisiologiaVegetal2008Azcon.pdf>.
- Skoog F, Miller CO, Okumura FS, Saltza MH von, Strong FM. 1956. Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division 1,2. *J. Am. Chem. Soc.* 78(7):1375–1380. doi:10.1021/ja01588a032.
- Valenzuela LR, Vera CV, Ruth LE, Eissenstat DM. 2008. Root anatomy, morphology, and longevity among root orders in *Vaccinium corymbosum* (*Ericaceae*). *Am J Bot.* 95(12):1506–1514. doi:10.3732/ajb.0800092.
- Vescan L, Pamfil D, Clapa D, Fira A, Sisea C, Pop I. 2012. Efficient micropropagation protocol for highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Elliot. *Romanian Biotechnological Letters*; [consultado el 6 de mar. de 2021]. 17(1):6893-6902. <https://www.researchgate.net/publication/>

230596349_Efficient_micropropagation_protocol_for_highbush_blueberry_Vaccinium_corymbosum_L_cv_27Elliot27.

Yparraguirre H, Muzaurieta L. 2020. Cultivo de Tejidos Vegetales. 1ª ed. Ica, Perú: Citeagroindustrial; [consultado el 23 de mar. de 2021]. 11 p. Boletín técnico. <http://www.citeagroindustrial.com.pe/es/>.