

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



Proyecto Especial de Graduación
Organogénesis directa en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.):
Revisión de Literatura

Estudiante

Antonio Josue Chicaiza Nacimba

Asesoras

María Alexandra Bravo, M.Sc.

Alejandra Sierra Augustinus, M.Sc.

Honduras, agosto 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA MARGARITA MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ROGEL CASTILLO

Director Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

| | |
|--|----|
| Índice de Cuadros..... | 4 |
| Resumen | 5 |
| Abstract..... | 6 |
| Introducción..... | 7 |
| Metodología..... | 10 |
| Revisión de Literatura | 11 |
| Micropropagación de Arándano | 11 |
| Organogénesis Directa..... | 12 |
| Fuentes de Explantes y Desinfección Superficial | 13 |
| Fase de Establecimiento para Regeneración de Brotes Adventicios..... | 16 |
| Fase de Multiplicación | 21 |
| Fase de Enraizamiento | 24 |
| Fase de Aclimatación | 26 |
| Conclusiones | 27 |
| Recomendaciones..... | 28 |
| Referencias..... | 29 |

Índice de Cuadros

| | |
|---|----|
| Cuadro 1 Medio de cultivo modificado Murashige y Skoog (MS) y Lloyd y McCown (WPM) para el establecimiento de <i>Vaccinium corymbosum</i> | 17 |
| Cuadro 2 Medio de cultivo de Murashige y Skoog MS completo para el establecimiento de <i>Vaccinium corymbosum</i> | 18 |
| Cuadro 3 Woody Plant Medium para establecimiento de <i>Vaccinium corymbosum</i> | 19 |
| Cuadro 4 Fase de Establecimiento con WPM más sus compuestos y su efecto en brotes por explante y su longitud en <i>Vaccinium corymbosum</i> | 20 |
| Cuadro 5 Medio de cultivo de Olive para el establecimiento in vitro de <i>Vaccinium corymbosum</i> | 20 |
| Cuadro 6 Multiplicación vía organogénesis directa el efecto de las dosis de Zeatina en arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> | 23 |
| Cuadro 7 Medio de cultivo OM (1/2) para enraizamiento in vitro de <i>Vaccinium corymbosum</i> | 25 |

Resumen

El arándano es en una fruta muy apetecida por la población y actualmente en muchos países es parte de la dieta diaria, por lo que su demanda es creciente. La propagación convencional de este cultivo ha tenido problemas por la baja tasa de enraizamiento al ser propagado por estacas y por la variabilidad de las plantas al ser propagado por semillas, obteniendo también desuniformidad en la calidad de fruto. Por esta razón la micropropagación es una buena alternativa para propagar masivamente este cultivo. Al existir actualmente una gran demanda de plántulas de arándano el objetivo de esta revisión de literatura es conocer el estado actual de la micropropagación de arándanos por la vía de organogénesis directa. Con los beneficios de la organogénesis directa se obtienen plántulas libres de plagas y genéticamente iguales a la planta madre. Ha sido reportado que el uso del medio basal WPM (Woody Plant Medium) para las etapas de establecimiento, multiplicación es mejor para la proliferación de brotes. El regulador de crecimiento zeatina (2 mg/L) induce la formación de brotes en establecimiento y multiplicación. Para enraizamiento también se ha reportado el uso del medio WPM suplementado con ácido indol butírico (IBA) (1 mg/L) con el fin de inducir el desarrollo y elongación de raíces adventicias. Sustratos compuestos por tierra, perlita y turba en proporción 1:1:1 facilitan la adaptación de las plántulas en invernadero durante la etapa de aclimatación.

Palabras clave: crecimiento por meristemas, cultivos *in vitro*, micropropagación, organogénesis, regeneración

Abstract

The blueberry is a very popular fruit among the population and currently in many countries is part of the daily diet, so its demand is growing. Conventional propagation of this crop has had problems due to the low rooting rate when propagated by cuttings and the variability of the plants when propagated by seeds, also resulting in a lack of uniformity in fruit quality. For this reason, micropropagation is a good alternative for the mass propagation of this crop. Since there is currently a great demand for blueberry seedlings, the objective of this literature review is to know the current status of blueberry micropropagation by direct organogenesis. With the benefits of direct organogenesis, pest-free seedlings genetically identical to the mother plant are obtained. It has been reported that the use of WPM (Woody Plant Medium) basal medium for the establishment and multiplication stages is better for shoot proliferation. The growth regulator zeatin (2 mg/L) induces shoot formation in establishment and multiplication. For root, the use of WPM medium supplemented with indole butyric acid (IBA) (1 mg/L) has also been reported to induce adventitious root development and elongation. Substrates with soil, perlite, and peat (1:1:1) facilitate seedling adaptation in the greenhouse.

Keywords: *in vitro* cultures, micropropagation, meristem growth, organogenesis, regeneration,

Introducción

El *Vaccinium corymbosum* L. conocido comúnmente como arándano azul, pertenece a la familia de las Ericáceas, es un fruto ampliamente demandado. Este cultivo tiene la facilidad de adaptarse a varios ambientes tales como bosques de montaña, páramos y matorrales. Los arándanos se desarrollan con un mejor vigor en una variedad de latitudes y temperaturas, generalmente entre 600 y 2700 msnm con temperaturas de 7 y 24 C°. Necesita un requerimiento de 100 -1200 horas frío, suelos ácidos (pH 4 y 5) con abundante materia orgánica, se desarrolla mejor en suelos franco-arenosos y sustratos orgánicos a base de fibra de coco. Es una planta muy sensible a terrenos saturados con poco drenaje, llega a morir en pocos días. Es un cultivo que necesita una buena porosidad y aireación en el suelo. El fruto del arándano tiene un alto contenido de antocianinas por esa razón su baya es de un color azul blanquecino (Mora 2010; Mesa Torres 2015; Abuo El-dis Mohamed et al. 2018; García Rubio et al. 2018).

Este cultivo es originario de Norteamérica, Europa Central y Eurasia (García Rubio et al. 2018). Por esta razón se considera el arándano como parte de la dieta diaria en países como Estados Unidos, Canadá, Holanda, Portugal, Suecia y España (Mesa Torres 2015; Romero Torres 2020). Estudios reflejan que el arándano es una fruta de alto contenido antioxidante, es diurética, anticancerígena y antibacteriana, se considera complementario en una alimentación sana (Debnath 2007b; Ross y Castillo 2009; Diaz et al. 2017; Cano Castillo 2018).

Actualmente Estados Unidos y Canadá producen el 40% de la producción mundial, Chile el 23%, Polonia, Países bajos y España con el 17%, Argentina 4% y Perú 3%. Esta especie leñosa es nueva en América Latina, se lo introdujo en los años 1980 a países como Chile, Argentina y Uruguay. Se plantea que en América Latina los países deberán garantizar que toda su población, especialmente a la siguiente generación tengan la disponibilidad de añadir el arándano a sus dietas, debido a sus grandes beneficios. Al convertirse esta fruta muy apetecida por la población, implicaría que en un

futuro deberá existir una producción constante (Mesa Torres 2015; Lerma Bocanegra et al. 2019; Ribón Barragan y Bernal Pérez 2020).

Estados Unidos es el principal productor (276 000 t/año), consumidor (1 kg per cápita/año) y exportador de arándano de todo el mundo. Sudamérica produce 124 000 t/año. Norte América lleva cifras de importación de 120 millones de dólares por año y económicamente el arándano eleva sus cifras anualmente un 50% en el mercado (Bustillo Álvarez 2018; Agrometrics Marzo, 2021). La demanda crece y se propone que esto aumentará a lo largo de los años. En América Latina la producción de arándano también aumenta, enfocado principalmente a la exportación (Rivadeneira et al. 2011; Riella et al. 2013).

El arándano convencionalmente se propaga por estacas, injertos y semillas. La propagación por estacas en arándano presenta bajos índices de enraizamiento, por lo que dificulta su establecimiento en campo. Al propagarlo a partir de la semilla las plantas difieren a la planta madre, obteniendo frutos heterogéneos y una producción de solo 5 - 10 años. Por otro lado, a partir de micropropagación se podría propagar masivamente plantas élite, con frutos homogéneos y una producción constante de 5 a 30 años, adecuando buenas prácticas de manejo. Dicho esto, el principal uso de la micropropagación en arándano es prolongar los años de vida de producción con frutos homogéneos de alta calidad y alto rendimiento (Tecanhuey Fernández 2012; Castro Fernández 2016; Ñacato 2020).

La micropropagación es una técnica para producir masivamente plántulas a partir de órganos o tejidos, controlando la temperatura, humedad relativa, horas luz, asepsia y medio de cultivo. El uso de esta técnica tiene la ventaja que permite la propagación masiva de plantas libres de patógenos si se realizan los procesos adecuados de saneamiento. La micropropagación del arándano ha sido un reto, debido a que es una especie arbustiva leñosa. Tiende a ser muy sensible a factores como el pH, estrés hídrico, patógenos, la temperatura y especialmente al método de micropropagación. Razón por

la que establecer esta planta es muy costoso. La plántula de arándano tiene un costo de USD 2.5 – 4 (dependiendo de la variedad), y se requieren 6000 a 10000 plantas por hectárea. El establecimiento de una hectárea de arándanos costaría USD 40 000 únicamente en plántulas (Castillo 2004; Tecanhuey Fernández 2012; Ñacato 2020).

Estudios de Mora (2010) y Debnath (2007a) demuestran que el arándano se puede micropropagar por la vía de regeneración de brotes adventicios (organogénesis directa), la iniciación de órganos (tallos u hojas) en masas de células vacuoladas de callo y parenquimatosas (organogénesis indirecta), que pueden desarrollar meristemas, donde controlando las condiciones del cultivo generarían brotes. La organogénesis directa, generación de brotes a partir de órganos preformados, podría inducir el crecimiento de brotes múltiples facilitando la producción masiva de plantas. Por otro lado, organogénesis indirecta que inicia con la formación de un tejido callogénico y a partir de este la generación de brotes, tiene la desventaja de producir plántulas con variaciones somaclonales. Al existir actualmente una gran demanda de plántulas de arándano y considerando que la organogénesis directa es una alternativa para la rápida multiplicación y propagación masiva de plantas élite, se realizó esta revisión de literatura con la que se da a conocer el estado actual de la micropropagación de arándanos por la vía de organogénesis directa.

Metodología

Para realizar esta revisión literaria se realizó búsqueda de artículos científicos, revistas científicas, tesis, entrevistas y resúmenes científicos todo a través del internet con el uso de las bases de datos Scielo, Redalyc, Agora, Asabe, e-libro, Jstor, Life Science, Proquest Agricultural Journal y Teal. En esta búsqueda bibliográfica no hubo límite de tiempo para la búsqueda de información, encontrando registros desde 1987 hasta el presente (2021), priorizando la información con los años más recientes. Dicho esto, la búsqueda se realizó entre los meses de enero y julio del 2021. Se excluyeron documentos en el idioma portugués por lo que la información en inglés y español fueron de gran importancia para la continuidad de la revisión. La mayoría de las publicaciones encontradas respectando a la organogénesis directa en arándano son de Asia y Medio Oriente traducidos al inglés. Los términos de búsqueda o palabras clave usadas fueron: organogénesis, micropropagación, arándano, *Vaccinium spp.*, cultivos *in vitro*, regeneración, crecimiento por meristemas.

Revisión de Literatura

Micropropagación de Arándano

La micropropagación de arándano es una importante herramienta para la multiplicación clonal masiva de la especie. Su uso ha generado grandes avances a la producción del cultivo en varias partes del mundo (América, Europa, Oriente y Asia). Para el arándano se consideran mejores explantes los provenientes de una planta joven a partir del tallo, hojas, nudos, ápices, yemas axilares y apicales. La obtención de plántulas de arándano puede ser por proliferación de brotes a partir de yemas preexistentes, regeneración de brotes a través de la organogénesis y la formación de embriones somáticos (Debnath 2007b, 2010).

Se ha realizado micropropagación de arándano por solo 30 años, y tanto investigadores como productores aciertan que la micropropagación es muy eficaz para la producción masiva de plántulas genéticamente iguales, lo que asegura la uniformidad de la calidad del fruto. Estudios demuestran que con el uso de la micropropagación en arándano se obtiene una producción rápida y continua de plántulas con un alcance de vida de producción 12 -30 años (Pritts y Hancock 1992; Lerma Bocanegra et al. 2019; Wang et al. 2019).

Las especies *Vaccinium* son alógamas y poliploides, esto quiere decir que con el uso de la propagación convencional en arándano no habrá mejoramiento de la especie, además de no reproducir una progenie idéntica a la planta madre, por lo que la planta crece con rasgos fisiológicos diferentes determinando un bajo e irregular rendimiento de fruta en el campo. Por lo que estudios de micropropagación demuestran que las plántulas de arándano producidas por esta técnica resultan homogéneas, expresando el potencial genético de la especie generando producciones de altos rendimientos 15 – 20 t/hectárea en comparación con 8 000 kg/ha que se generan mediante la

reproducción sexual (Cao y Hammerschlag 2000; Toro Cano 2009; Debnath 2010; Mohamed et al. 2018).

Uno de los mayores problemas que tiene la micropropagación de arándano es el difícil acceso de una planta madre certificada, por lo que se usan plantas madre del campo o invernaderos, establecidas por productores independientes. Este material vegetal de arándano que se usará para explante está más susceptible a sufrir oxidación en el medio de cultivo (Mccown y Sellmer 1987; Jiménez-Bonilla y Abdelnour-Esquivel 2016). La causa de la oxidación de fenoles inicia desde la separación del material vegetal de la planta madre, ocasionando un estrés en los tejidos. Este estrés es ocasionado por la falta de luz, oxígeno, y la manipulación y movimiento del material vegetal. Además, el tiempo que toma el traslado del material vegetal hasta el lugar donde se micropropaga ocasiona más estrés. Al obtener los explantes, estos están susceptibles a provocar un estrés oxidativo generalmente ocasionado por los cortes realizados para separar estos de la planta madre. Este estrés oxidativo puede originar una serie de reacciones químicas por radicales libres, ocasionando la oxidación u oscurecimiento de tejidos *in vitro* de arándano. Por lo que se recomienda, si es posible, movilizar las plantas de arándano para realizar los cortes de explante en el lugar de micropropagación (Azofeifa 2009; Rodríguez Beraud y Morales Ulloa 2015; Ribón Barragan y Bernal Pérez 2020).

Se deben optimizar las condiciones *in vitro* para cada variedad o genotipo de arándano y para cada tipo de explante, ya que tienen requerimientos específicos como la composición del medio de cultivo y concentración de sales, el pH, las condiciones atmosféricas de las cámaras de crecimiento y finalmente los reguladores de crecimiento (Mccown y Sellmer 1987; Debnath 2007b; Arista Bustamante et al. 2020; Ribón Barragan y Bernal Pérez 2020).

Organogénesis Directa

La regeneración de brotes por la vía de organogénesis directa se considera eficaz para la obtención de un gran número de plántulas a partir del establecimiento *in vitro* de órganos

preformados de yemas con hojas, segmentos nodales, segmentos foliares (Ross y Castillo 2009; Arista Bustamante et al. 2020).

Debnath (2007a) propone para tener una mejor respuesta en regeneración de brotes a partir de hojas se toma mucho en cuenta la orientación y la polaridad del explante (adaxial). Arista (2020), Lerma (2019) y Beraud (2015) plantea que los explantes preformados a partir de segmentos nodales en arándano resulta ser un método eficaz, sin generar variaciones somaclonales en las plantas. Wang (2019) recalca que el uso de organogénesis directa en arándano además proporciona plántulas libres de patógenos en tan solo en seis meses si se usa como explantes domos meristemáticos o meristemas con un par de primordios.

Sin embargo, una amplia variedad de factores físicos, biológicos y químicos pueden afectar a un protocolo específico de micropropagación por organogénesis, los más involucrados son los reguladores de crecimiento y el medio de cultivo. Se considera a que la organogénesis directa es una técnica altamente dependiente al genotipo que se desea propagar, razón por la cual es necesario realizar experimentos y ajustar los protocolos para cada variedad (Debnath 2010; Ružić et al. 2012).

Fuentes de Explantes y Desinfección Superficial

El explante es extraído de una planta madre con las condiciones fisiológicas deseadas y efectivas para propagación. En el arándano varios explantes que pueden ser usados para el cultivo de tejidos, tales como segmentos nodales, yemas, meristemas, domos meristemáticos. Para la inducción a organogénesis directa se recomienda utilizar explantes que contengan una alta actividad meristemática (Carrión Paredes 2020; Ribón Barragan y Bernal Pérez 2020).

En arándano se recomienda el uso de diferentes componentes como hipoclorito de sodio o calcio, etanol y cloruro de mercurio para reducir la contaminación de los explantes, generando un

adecuado protocolo de micropropagación (Hine-Gómez y Abdelnour-Esquivel 2013; Jiménez-Bonilla y Abdelnour-Esquivel 2016).

Para la desinfección de micro estacas Aquije (2020) plantea el uso de hipoclorito de sodio de una solución comercial al 10% volumen/volumen, y luego lavar con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar. Abu El-dis Mohamed (2018) recomienda para obtener un 100% de tasa de supervivencia de los explantes a partir de segmentos nodales, usar una solución de NaOCl al 15% volumen/volumen durante 15 minutos.

Para la desinfección de hojas con yemas Quispe (2019) plantea que al cortar el material vegetal, los explantes de 1 cm se deben colocar en un frasco con una solución de Tween20® y posteriormente lavarlos con agua destilada. Los explantes a continuación deben sumergirse en una solución de alcohol al 70% durante 1 minuto, luego los explantes se colocan en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% (ingrediente activo) manteniéndolos en constante movimiento durante 5 minutos. Finalmente lavar los explantes tres veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de las soluciones. Para evitar la fenolización del material vegetal, antes de establecer los explantes Quispe (2019) sumergió los explantes en una solución de ácido ascórbico (100 mg/L) por 5 minutos.

Con explantes de tallos con yemas, Tecanhuey (2012) realizó el lavado manual de los tallos con yemas con detergente y agua corriente, realizando movimientos muy cuidadosos para evitar daños físicos. Después tratar el material vegetal en una solución comercial de hipoclorito de sodio a 20% v/v (6% ingrediente activo) por un tiempo máximo de 20 minutos. Igualmente, para evitar la fenolización utilizó un paso adicional, lavando los explantes cuatro veces en una solución de cisteína (25 mg/L).

Mroginski (1993) y Jiménez-Bonilla (2016) demuestran que el uso de enjuagues con antioxidantes (ácidos ascórbicos y cítricos), más la adición de carbón activado son efectivos para disminuir la oxidación del material vegetal. Agregando que Brenes (2015), Arista (2020) y Hine-Gómez

(2013) concuerdan con el uso de antioxidantes tales como el ácido ascórbico (150 -200 mg/L) y la Cisteína (2 - 3 mL/L). Por otro lado, el uso de cloruro de mercurio en bajas concentración y en periodos cortos (0.20% durante 5 minutos) mostró ser efectivo para la desinfección de material vegetal.

Cuando los explantes son extraídos de una planta madre que está en el campo, Lerma (2019) recomienda que los tallos sean sumergidos en una solución de ácido ascórbico (150 mg/L) y ácido cítrico (150 mg/L) durante 20 minutos, esto disminuye la posibilidad de oxidación en los tejidos. Continuamente se lava con agua estéril y después se somete los tallos a una solución de Extran® (líquido alcalino) al 0.1% durante 30 minutos, lavándolos a continuación con agua destilada estéril. Mas adelante se sumerge en una solución de alcohol al 70% por 30 segundos solamente. Finalmente, los tallos se sumergen en una solución de NaOCl 1% por 10 minutos y se toman como explantes segmentos nodales con dos yemas axilares de 2 cm solamente.

En la desinfección de tallos para segmentos nodales Bernal (2020), Arista (2020) y Meiners (2007) consideran el uso de tallos jóvenes relativamente lignificados libres de patologías. El tamaño de estos tallos debe ser aproximadamente de 5 - 12 cm. Para la limpieza superficial se realiza un lavado de agua y jabón, al terminar este proceso se deberá seccionar los pequeños explantes con un tamaño de 2 - 3 cm. Posterior a este proceso iniciaría la desinfección, donde los explantes son sumergidos en alcohol al 70%, por un tiempo de 60 segundos. A continuación, a una inmersión en NaOCl al 3%, añadiendo dos gotas de Tween 20®, agitándolo por 10 minutos. Finalmente, se enjuagarían tres veces con agua estéril. Por otro lado, Wang (2019) igualmente para segmentos nodales empapó los tallos en una solución de detergente al 10% (v/v) por 10 minutos y luego lavó los tallos con agua corriente durante 30 minutos. Luego de la extracción de los explantes (1.5 - 2 cm) estos fueron desinfectados en etanol al 75% (v/v) por 15 segundos, seguido por una incubación de 6 minutos en una solución de bicloruro de mercurio a 0.1% (v/v) y Tween 20® a 0.02% (v/v) y termina con tres enjuagues en agua desionizada estéril. Ostrolucká (2004) y Ružić (2012) determinaron efectiva la esterilización de

explantes en una solución de etanol al 70% durante 2 minutos y posteriormente en una solución de cloruro de mercurio del 0.1% por 6 minutos.

Fase de Establecimiento para Regeneración de Brotes Adventicios

Para esta fase de la micropropagación el objetivo es introducir los explantes (segmentos nodales, yemas, meristemas) al medio de cultivo y mantenerlos en condiciones de asepsia. En esta fase el tamaño del explante influye al riesgo de contaminación y la efectividad de regenerar brotes, es mejor explantes de menor tamaño, pero puede que su sobrevivencia sea menor. Al no realizar un establecimiento exitoso, los explantes estarían expuestos a la regeneración de brotes a partir de callo, oxidación y contaminación. La formación de callo no es deseada ya que generaría variaciones somaclonales. Utilizando el medio de cultivo y requerimiento nutricional acorde a la especie facilitaría el proceso de multiplicación por la que se podrían obtener una masiva producción de brotes (Jain y Häggman 2007; Arista Bustamante et al. 2020).

De acuerdo con Debnath (2001), Jain (2007) y Mohamed et al. 2018 el establecimiento del género *Vaccinium spp.* es mejor en el medio para plantas leñosas o WPM por sus siglas en inglés (Woody Plant Medium) de Lloyd y McCown (1982), debido a que sus componentes tienen bajas concentraciones iónicas. El arándano un cultivo acidófilo por la que sus condiciones se deben mantener entre un pH de 4.5 – 5. Se plantean que las condiciones de establecimiento deben ser durante 45-60 días, manteniendo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura de 20°C.

Lerma (2019) plantea el uso del medio MS (Murashige y Skoog 1962) modificado con un 50% de MS y 50% con WPM (Lloyd y McCown 1982)(Cuadro 1) suplementado con zeatina (2 mg/L) y sacarosa (15 g/L), solidificado con agar (8 g/L) su combinación en este medio modificado resultó con 5 brotes por explante, con una longitud de 3 cm.

Cuadro 1

Medio de cultivo modificado Murashige y Skoog (MS) y Lloyd y McCown (WPM) para el establecimiento in vitro de yemas de arándano (Vaccinium corymbosum L.)

| Componentes | Fórmula | Nombre Común | MS 50% (mg/L) | WPM 50% (mg/L) |
|-----------------|--|--|------------------|-------------------|
| Macroelementos | NH ₄ NO ₃ | Nitrato de amonio | 825.000 | 200.000 |
| | KNO ₃ | Nitrato de potasio | 950.000 | |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | Sulfato de magnesio heptahidratado | 185.000 | 185.000 |
| | CaCl ₂ ·2H ₂ O | Cloruro de calcio bihidratado | 220.000 | 48.000 |
| | KH ₂ PO ₄ | Fosfato monobásico de potasio | 85.000 | 85.000 |
| | Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | Nitrato de calcio | | 278.000 |
| Micronutrientes | KI | Yoduro de potasio | 0.415 | |
| | H ₃ BO ₃ | Ácido trioxobórico | 3.100 | 3.100 |
| | MnSO ₄ ·4H ₂ O | Sulfato de manganeso tetrahidratado | 11.150 | 11.150 |
| | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | Sulfato de zinc heptahidratado | 4.300 | 4.300 |
| | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | Molibdato de sodio dihidratado | 0.125 | 0.125 |
| | CuSO ₄ ·5H ₂ O | Sulfato de cobre pentahidratado | 0.013 | 0.125 |
| | CoCl ₂ ·6H ₂ O | Cloruro de cobalto hexahidratado | 0.013 | |
| | Na ₂ EDTA | Sal disódica de EDTA dihidrato | 18.650 | 18.650 |
| | FeSO ₄ ·7H ₂ O | Sulfato ferroso heptahidratado | 13.900 | 13.900 |
| | | Mioinositol | | 50.000 |
| | | Glicina | | 1.000 |
| | | Tiamina | | 1.000 |
| | | Ácido nicotínico | | 0.500 |
| | | Piridoxina | | 0.500 |
| | Cisteína | | 2.500 | |
| | Polivinilpirrolidona | | 50.000 | |
| pH | | | | 4.800 |

Nota. Recopilado por Arista Bustamante et al. 2020

Brenes (2015) indica que el uso del medio de cultivo Murashige y Skoog completo (Cuadro 2) para el establecimiento de segmentos nodales con una yema axilar (1 cm) suplementado con Bencilaminopurina (BAP) (2 mg/L), sacarosa (3 g/L) y solidificado con phytigel (2 g/L), obteniendo

entre 9 – 37 brotes por explantes. Lerma (2019) y Brenes (2015) indican que el medio basal MS induce a más brotes.

Cuadro 2

Medio de cultivo de Murashige y Skoog MS completo para el establecimiento de Vaccinium corymbosum

| Componentes | Formula | Nombre Común | mg/L |
|----------------|--|----------------------------------|---------|
| Macroelementos | CaCl ₂ | Cloruro de Calcio | 332.200 |
| | MgSO ₄ | Sulfato de Magnesio | 180.690 |
| | KNO ₃ | Nitrato de Potasio | 190.000 |
| Microelementos | KH ₂ PO ₄ | Fosfato Mono potásico | 170.000 |
| | H ₃ BO ₃ | Ácido Bórico | 6.200 |
| | CoCl ₂ | Cloruro de cobalto | 0.025 |
| | CuSO ₄ | Sulfato de cobre | 0.025 |
| | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ *2Na*2H ₂ O | Sal disódica de EDTA dihidratado | 37.300 |
| | FeSO ₄ | Sulfato de hierro | 27.800 |
| | MnSO ₄ | Sulfato de manganeso | 16.900 |
| | MoO ₃ ·H ₂ O | Ácido molibdico | 0.213 |
| | KI | Yoduro de Potasio | 0.830 |
| | ZnSO ₄ | Sulfato de cinc | 8.600 |
| Vitaminas | C ₆ H ₁₂ O ₆ | Inositol | 100.000 |
| | C ₆ H ₅ NO ₂ | Vitamina B3 | 0.500 |
| | C ₈ H ₁₁ NO ₃ | Vitamina B6 | 0.500 |
| | C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS+ | Tiamina | 0.100 |
| Aminoácido | C ₂ H ₅ NO ₂ | Glicina | 2.000 |
| pH | | | 5.5 |

Nota. Recopilado por Murashige y Skoog 1962

Mohamed et al. (2018), Mora (2010), Meiners et al. (2007) utilizaron el medio de cultivo WPM (Cuadro 3). Usando yemas Mohamed (2018) suplementa zeatina (1mg/L) más ácido indol butírico (IBA)(0.1mg/L), obteniendo 3.9 brotes por explante de una altura de 3.22 cm; y Mora (2010) establece un protocolo con Isopentiladenina (2IP)(2 mg/L) y Bencil Adenina (BA)(1 mg/L), obteniendo 5.4 brotes por explante con una altura de 5 mm. Con el uso de segmentos nodales como explantes Meiners et al. (2007) para esta fase de establecimiento suplementa zeatina (2.07 mg/L) obteniendo el 51% de los explantes con brotes, estos brotes con hojas de color verdes y rojos (Cuadro 4). En el Cuadro 4 se

puede observar los resultados obtenidos por el uso de los medios WPM y Olive Medium (OM), respecto al número de brotes por explante y su longitud. El uso de la zeatina tiene gran influencia para el establecimiento de arándano diferenciando mucho sus dosis y los resultados observados por los investigadores. Mohamed et al. 2018 además agrega auxina al medio y obtiene tres brotes por explante.

Cuadro 3

Medio de Lloyd y McCown (Woody Plant Medium) para establecimiento in vitro de arándano

Vaccinium corymbosum

| Componentes | Formula | Nombre Común | mg/L |
|----------------|--|------------------------------------|-----------|
| Macroelementos | NH_4NO_3 | Nitrato de amonio | 400.000 |
| | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Cloruro de calcio | 72.500 |
| | $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | Nitrato de calcio monohidratado | 386.340 |
| | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | Sulfato de magnesio | 180.690 |
| | KH_2PO_4 | Fosfato de potasio monobásico | 170.000 |
| | K_2SO_4 | Sulfato de potasio | 990.000 |
| Microelementos | H_3BO_3 | Ácido trioxobórico | 6.200 |
| | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | Sulfato de cobre pentahidratado | 0.025 |
| | Na_2EDTA | Sal disódica de EDTA dihidrato | 37.300 |
| | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | Sulfato ferroso heptahidratado | 27.800 |
| | $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | Sulfato de manganeso monohidratado | 22.300 |
| | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Ácido molibdico (Sal de sodio) | 0.213 |
| | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | Sulfato de Zinc heptahidratado | 8.600 |
| Vitaminas | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ | Inositol | 100.000 |
| | $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ | Ácido Nicotínico (Ácido libre) | 0.500 |
| | $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$ | Piridoxina HCl | 0.500 |
| | $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{OS}^+$ | Clorhidrato de tiamina | 1.000 |
| Aminoácido | $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ | Glicina | 2.000 |
| | | Sacarosa | 20000.000 |
| pH | | | 5 |

Nota. Recopilado por Lloyd y McCown 1982

Cuadro 4

Fase de Establecimiento con WPM más sus compuestos y su efecto en brotes por explante y su longitud en Vaccinium corymbosum

| | Mohamed et al. 2018 | Mora 2010 | Meiners et al. 2007 | Wang Y et al. 2019 |
|----------------------|---------------------|-----------|---------------------|--------------------|
| Medio basal | WPM | WPM | WPM | OM |
| Inositol | 100 mg/L | 100 mg/L | 100 mg/L | 100 mg/L |
| Zeatina | 1 mg/L | | 2 mg/L | 2 mg/L |
| Ácido indol butírico | 0.1 mg/L | | | |
| Isopentiladenina | | 2 mg/L | | |
| Tiamina | | 0.4 mg/L | | |
| Bencil adenina | | 1 mg/L | | |
| Kinetina | | | | 0.1 mg/L |
| Brotos/explante | 3.9 | 5.4 | no reportado | 1 |
| Longitud (cm) | 3.22 | 5.5 | no reportado | 2 |

Nota. Elaboración propia

Wang (2019) establece arándano en un medio basal OM de Rugini 1984 (Cuadro 5) suplementado con zeatina (2 mg/L) y kinetina (0.1 mg/L) obteniendo un brote por explante con una altura de 2 cm. Siendo este el estudio más actualizado encontrado con respecto al establecimiento de arándano.

Cuadro 5

Medio de cultivo de Olive para el establecimiento in vitro de Vaccinium corymbosum

| Componentes | Formula | Nombre Común | mg/L |
|----------------|--|------------------------------------|----------|
| Macroelementos | NH ₄ NO ₃ | Nitrato de amonio | 412.000 |
| | CaCl ₂ | Cloruro de Calcio | 332.200 |
| | Ca(NO ₃) ₂ | Nitrato de calcio | 416.920 |
| | MgSO ₄ | Sulfato de magnesio | 732.600 |
| | KCl | Cloruro de potasio | 500.000 |
| | KNO ₃ | Nitrato de potasio | 1100.000 |
| | KH ₂ PO ₄ | Fosfato de potasio monobásico | 340.000 |
| Microelementos | H ₃ BO ₃ | Ácido Bórico | 12.400 |
| | CoCl ₂ | Cloruro de cobalto | 0.025 |
| | CuSO ₄ | Sulfato de cobre | 0.250 |
| | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ .2Na.2H ₂ O | Sal disódica de EDTA dihidratado | 37.300 |
| | FeSO ₄ .7H ₂ O | Sulfato ferroso heptahidratado | 27.800 |
| | MnSO ₄ .H ₂ O | Sulfato de manganeso monohidratado | 16.900 |
| | MoO ₃ .H ₂ O | Ácido molibdico | 0.213 |
| | KI | Yoduro de Potasio | 0.830 |
| Vitaminas | ZnSO ₄ | Sulfato de cinc | 14.300 |
| | C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S | Biotina | 0.050 |
| | C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆ | Ácido fólico | 0.500 |
| | C ₆ H ₁₂ O ₆ | Inositol | 100.000 |
| | C ₆ H ₅ NO ₂ | Vitamina B3 | 5.000 |
| | C ₈ H ₁₁ NO ₃ | Vitamina B6 | 0.5 |
| | C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS+ | Clorhidrato de tiamina | 0.500 |
| Aminoácido | C ₂ H ₅ NO ₂ | Glicina | 2.000 |
| | | Sacarosa | 8200.000 |
| pH | | | 5 |

Nota. Recopilado por Rugini 1984

Fase de Multiplicación

En esta etapa el objetivo es mantener o aumentar la proliferación de brotes a partir del explante establecido. Investigadores afirman que para la multiplicación *in vitro* tiene mucho que ver la respuesta que la especie tiene al medio de cultivo, reguladores de crecimiento y las condiciones de

crecimiento (Roca y Mroginski 1993; Rodríguez Beraud y Morales Ulloa 2015; Arista Bustamante et al. 2020).

Para la rápida proliferación de brotes en esta fase de multiplicación Wang (2019) establece que el uso de un medio de cultivo OM suplementado con zeatina (2 mg/L), ácido naftalenacético ANA (2 mg/L) y kinetina (0.05 mg/L) obteniendo un 95.57% de brotes adventicios. Plantea que el medio de cultivo OM para la fase de multiplicación induce la regeneración de brotes sanos. Los primeros brotes se observaron a los cinco días, a los 15 días observó un crecimiento vigoroso de los explantes y un pequeño callo verde en la base del explante. Después de cinco días el callo preformado diferenció a un agrupamiento pequeño de brotes donde después de 60 días formó un gran agrupamiento de brotes y logra obtener 60 brotes agrupados con un tamaño de 3 cm de largo (Cuadro 6). Wang (2019) explica que la efectividad de esta fase de multiplicación se debe al medio de cultivo OM, explica que su alto contenido de nitrógeno, glutamina y fósforo favoreció a regeneración de brotes. Esto debido a que el nitrógeno tiene un rol importante en la multiplicación, su capacidad de inducir división celular, diferenciación, crecimiento y desarrollo es apropiado para expresar el potencial genético de la especie de arándano.

Por otro lado, Arista Bustamante et al. (2020) utilizan WPM en esta fase suplementando agar (8 g/L), sacarosa (30 g/L) y zeatina (2 mg/L) ajustando el pH a 5.35. A los 50 días obtienen 3.6 brotes por explante (Cuadro 6) con un tamaño de 4.10 cm y 26 hojas por brote. Además, señalan que el uso de trans-zeatina (2 mg/L) como regulador de crecimiento igualmente resulta en la formación de 3.6 brotes por explante y 30.1 hojas por brote. Propone además que los explantes de arándano tienden a tener diferentes respuestas según la citoquinina suplementada al medio, es razón para optimizar diferentes condiciones *in vitro* para cada variedad a cultivar con el objetivo de conseguir mejores resultados en esta fase de multiplicación.

Con los explantes preformados en el establecimiento mencionado anteriormente Mohamed et al. (2018) utiliza WPM suplementado con zeatina (1 mg/L) y ácido indol butírico IBA (0.1 mg/L). Su proceso de multiplicación tiene gran significancia porque hace cinco subcultivos con el mismo tipo de medio durante ocho semanas, en el subcultivo cuatro se obtuvo un resultado de 5.5 brotes por explante (Cuadro 6) con un tamaño de 3.33 cm. Recalca que en el quinto subcultivo el explante inició el desarrollo de hiperhidricidad; una mal formación fisiológica resultante de un exceso de humedad.

Por otra parte, Meiners et al. (2007) reportan la generación de brotes a partir de vitro hojas preformadas en el establecimiento y usa el medio WPM suplementado con zeatina (2.3 mg/L) obteniendo 15.8 brotes por explante (Cuadro 6).

Cuadro 6

Multiplicación vía organogénesis directa el efecto de las dosis de Zeatina en arándano Vaccinium corymbosum

| Medio | Zeatina (mg/L) | Número de brotes | Días | Referencia |
|-------|----------------|------------------|------|-------------------------------|
| OM | 2 | 60 | 60 | Wang et al. 2019 |
| WPM | 2 | 3.6 | 50 | Arista Bustamante et al. 2020 |
| WPM | 1 | 5.5 | 56 | Mohamed et al. 2018 |
| WPM | 2.3 | 15.8 | 56 | Meiners et al. 2007 |
| WPM | 0.5 | 38.1 | 112 | Brenes Angulo et al. 2015 |

En el cultivo *in vitro* de arándano las citoquininas se utilizan para promover la división celular e incrementar la proliferación de brotes. El uso de la zeatina ayuda a que la tasa de supervivencia del explante suba a un 88% y ayuda a reducir la oxidación (Rodríguez Beraud y Morales Ulloa 2015; Schuch y Tomaz 2019). Meiners (2007) asegura que, si se quiere remplazar la zeatina por otro componente que obtenga los mismos resultados, sería este el Meta-Topolin, es una citoquinina aromática que tiene las mismas actividades meristemáticas de la zeatina en el medio de cultivo; su uso es dedicado solamente a la proliferación de brotes a partir de segmentos nodales y actualmente existen muy pocos estudios con respecto al tema en arándano. Brenes Angulo et al. (2015) plantea que se puede obtener

un gran número de brotes en multiplicación a partir de los pocos brotes por explante que se puedan generar en el establecimiento. Sugiere que el uso de subcultivos ayuda a la estabilizar la tasa de brotes para la multiplicación de arándano. Las auxinas por otra parte tienen el objetivo de promover la elongación de tejido celular y en el caso del arándano investigadores no lo toman como prioridad en esta fase de multiplicación (Hine-Gómez y Abdelnour-Esquivel 2013; Wang Y et al. 2019).

Fase de Enraizamiento

Meiners et al. (2007) asegura que al usar ácido naftalenacético (ANA) en esta fase a partir de cultivo de tejidos, la plántula estaría susceptible a la formación de callo y no habría ninguna generación de raíces. Mohamed et al. (2018) asegura que al utilizar procesos *in vitro* en esta fase de enraizamiento el regulador de crecimiento ácido indol butírico (AIB) es la auxina más apropiada para desarrollar raíces en la plántula arándano. Plantea que las auxinas para esta fase tienen mucha importancia, puesto a que ayuda a la elongación de raíces pequeñas, su accionar está en no formar células epidérmicas, contribuyendo a que exista una elongación celular en el explante, generando así raíces.

Según Wang et al. (2019) el mejor sistema en enraizamiento *in vitro* es el uso del medio OM al 50% (Cuadro 7) suplementado con ácido indol butírico AIB (2mg/L), ácido naftalenacético ANA (1mg/L) y cloruro de cloromequat CCC (0.01mg/L). Este medio para enraizamiento tuvo una tasa de enraizamiento de 27.61%. Asegura que el proceso de enraizamiento está muy susceptible a contaminación debido a la manipulación que tiene la plántula a un nuevo medio de cultivo. Además, recomienda que se use el cloruro de cloromequat para mejorar la tasa de enraizamiento de la plántula.

Cuadro 7

Medio de cultivo OM al 50% para enraizamiento in vitro de Vaccinium corymbosum

| Componentes | Formula | Nombre Común | mg/L |
|----------------|--|------------------------------------|---------|
| Macroelementos | NH ₄ NO ₃ | Nitrato de amonio | 206.000 |
| | CaCl ₂ | Cloruro de Calcio | 166.100 |
| | Ca(NO ₃) ₂ | Nitrato de calcio | 208.460 |
| | MgSO ₄ | Sulfato de magnesio | 366.300 |
| | KCl | Cloruro de potasio | 250.000 |
| | KNO ₃ | Nitrato de potasio | 550.000 |
| | KH ₂ PO ₄ | Fosfato de potasio monobásico | 170.000 |
| Microelementos | H ₃ BO ₃ | Ácido Bórico | 6.200 |
| | CoCl ₂ | Cloruro de cobalto | 0.013 |
| | CuSO ₄ | Sulfato de cobre | 0.125 |
| | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ *2Na*2H ₂ O | Sal disódica de EDTA dihidratado | 18.650 |
| | FeSO ₄ .7H ₂ O | Sulfato ferroso heptahidratado | 13.900 |
| | MnSO ₄ .H ₂ O | Sulfato de manganeso monohidratado | 8.450 |
| | MoO ₃ .H ₂ O | Ácido molibdico | 0.107 |
| | KI | Yoduro de Potasio | 0.415 |
| | ZnSO ₄ | Sulfato de cinc | 7.150 |
| Vitaminas | C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S | Biotina | 0.025 |
| | C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆ | Ácido fólico | 0.250 |
| | C ₆ H ₁₂ O ₆ | Inositol | 50.000 |
| | C ₆ H ₅ NO ₂ | Vitamina B3 | 2.500 |
| | C ₈ H ₁₁ NO ₃ | Vitamina B6 | 0.250 |
| | C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS+ | Clorhidrato de tiamina | 0.250 |
| Aminoácido | C ₂ H ₅ NO ₂ | Glicina | 1.000 |
| pH | | | 5 |

Nota. Recopilado por Wang Y et al. 2019

Mohamed et al. 2018 y Meiners et al. 2007 recomiendan el uso de WPM para la fase de enraizamiento *in vitro*. Mohamed et al. (2018) suplementa AIB (1 mg/L) obteniendo resultados en 70 días de 5.9 raíces por plántula de 1.05 cm. Meiners et al. (2007) suplementa AIB (1.15 mg/L) obteniendo 9.3 raíces por plántula en 56 días.

El AIB (1.5 mg/L) mejora el desarrollo de raíces en arándano, obtiene mayor longitud la plántula y las raíces. Además, la combinación de AIB y carbón activado permite generar un mayor

número de raíces. El carbón activado ayuda a generar mejores repuestas morfogénicas de los tejidos, ya que absorbe compuestos fenólicos y suprime la formación de callos en el medio promoviendo la formación de raíces adventicias. Para las plántulas de arándano se recomienda utilizar un sistema *in vitro* para enraizar, al utilizar enraizamiento *ex vitro* no se generan raíces fuertes por lo que la plántula llega a morir en esta fase o en la de aclimatación (Rocha Granados y López Medina 2017).

Fase de Aclimatación

Para esta fase de aclimatación Wang Y et al. (2019) realizan una rápida inmersión de los explantes a una solución de AIB a 1000 – 2000 mg/L obteniendo una tasa de supervivencia del 90% . Además, Debnath y McRae (2001), Ross y Castillo (2009) y Meiners et al. (2007) aseguran que para aclimatar los explantes se debe usar una cámara de humedad o invernadero con una constante humedad relativa de 85-100%. Para obtener una constante humedad. Brenes Angulo et al. (2015) sugieren tener una frecuencia de riego de 1 minuto cada 2 horas cuatro veces al día. Para obtener mejores resultados del crecimiento de la plántula es mantener esta fase de aclimatación por 16 semanas en un sustrato orgánico de 1:1 turba y perlita, 3:2 de turba y perlita o 1:1:1 de tierra, perlita y turba. Se mantiene un desarrollo homogéneo de las plántulas si se mantienen en un invernadero con riego por goteo, facilitando el manejo del cultivo.

Conclusiones

El uso de la organogénesis directa para la micropropagación de arándano puede obtenerse masivas producciones de plántulas homogéneas y libres de patógenos.

El medio de cultivo más utilizado para la organogénesis directa es el Woody Plant Medium de Lloyd y McCown 1982, para la fase de establecimiento y multiplicación suplementado con zeatina (2 mg/L) y para la fase de enraizamiento IBA (2 mg/L) .

Se determina que para la fase de aclimatación la plántula de arándano necesita una constante humedad relativa y sustratos adecuados.

Recomendaciones

Realizar pruebas experimentales según esta revisión de literatura para efectuar la efectividad de la organogénesis directa en arándano y su masiva proliferación de brotes.

Referencias

- Abuo El-dis Mohamed GR, Hugo B, Zavdetovna K, Arnoldovna TO. 2018. A research approach supporting micropropagation and domestication of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in Egypt. *EurAsian Journal of BioSciences*; 12(2):205–210.
- Agrometrics. Marzo, 2021. Demanda de arándanos se dispara en EE.UU conforme avanza el 2021. Perú. <https://www.redagricola.com/pe/demanda-de-arandanos-se-dispara-en-ee-uu-conforme-avanza-el-2021/>.
- Aquije Valiente JP. 2020. Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) -variedad Biloxi [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 22 p.
- Arista Bustamante JP, Leiva Espinosa ST, Guerrero Abad JC, Collazos Silva R. 2020. Efecto de las citoquininas en la multiplicación in vitro de cuatro variedades de *Vaccinium corymbosum*, a partir de segmentos nodales Effect of cytokinins on the in vitro multiplication of four varieties of *Vaccinium corymbosum*. *Revista Científica Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas: Ciencias Naturales e Ingeniería*. 2(2):55–62. doi:10.25127/ucni.v2i2.520.
- Azofeifa Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1):153–175.
- Brenes Angulo A, Castillo Matamoros R, 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.
- Bustillo Álvarez A. 2018. El cultivo del arándano (*Vaccinium corymbosum*) y su proyección en Colombia [Trabajo de Pregrado]. Colombia: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. 67 p.
- Cano Castillo EG. 2018. Efecto de aplicación de diferentes dosis de agrocimax plus (citoquinina), sobre el rendimiento de fruta en arándano (*Vaccinium corimbosum* L.) variedad biloxi en la provincia de Huaylas-Ancash [Tesis]. Huaraz, Perú: Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo.
- Cao X, Hammerschlag FA. 2000. Improved Shoot Organogenesis from Leaf Explants of Highbush Blueberry. *HortScience*; 35(5):945–947. doi:10.21273/HORTSCI.35.5.945.
- Carrión Paredes JA. 2020. Multiplicación in vitro de plátano: Revisión de literatura [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 26 p.
- Castillo A. 2004. Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas, Uruguay: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. 8 p. INIA Serie actividades de Difusión Informe no. 382.

- Castro Fernández AM. jul. 2016. Mejora de la propagación in vitro de "Vaccinium corymbosum" y evaluación de la actividad antioxidante en arándanos comerciales [Tesis]. Coruña, España: Universidad de Coruña. 40 p.
- Debnath SC. 2007a. Propagation of Vaccinium in Vitro. *International Journal of Fruit Science*; 6(2):47–71. doi:10.1300/J492v06n02_04.
- Debnath SC. 2007b. Strategies to propagate Vaccinium nuclear stocks for the Canadian berry industry. *Canadian Journal of Plant Science*. 87(4):911–922. doi:10.4141/P06-131.
- Debnath SC. 2010. Propagation and cultivation of Vaccinium species and less known small fruits. *Latvian Journal of Agronomy*; (12):22–29.
- Debnath SC, McRae KB. 2001. In Vitro Culture of Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *Small Fruits Review*; 1(3):3–19. doi:10.1300/J301v01n03_02.
- Díaz CR, Hebert Jair Barrales-Cureño, Reyes-Reyes C, Langer N. 2017. Antioxidant Behavior Analysis of Cranberry Fruits (*Vaccinium corymbosum* L.). [sin lugar]. 281 p.
- García Rubio JC, García Gonzáles de Lena G, Ciordia Ara M. 2018. El cultivo de arándano en el norte de España. España: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). 188 p.
- Global Forum. 2020. Árandano en Ecuador. Entrevista con Ñacato P. Ecuador. 2020.
- Hine-Gómez A, Abdelnour-Esquivel A. 2013. Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). *Revista Tecnología en Marcha*; 26(4):64–71. doi:10.18845/tm.v26i4.1584.
- Jain SM, Häggman H, editores. 2007. *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht: Springer. 559 p. ISBN: 9781402063510. eng.
- Jiménez-Bonilla V, Abdelnour-Esquivel A. 2016. Establecimiento in vitro de (*Vaccinium consanguineum*), un arándano nativo de Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*; 29(2):77–84. doi:10.18845/tm.v29i2.2692.
- Lerma Bocanegra SL, García D, Fandiño W, Díaz Escobar W. 2019. Propagación in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) a partir de yemas axilares. *Revista Siembra del Centro de Biotecnología Agropecuaria*; (2):9–19.
- Lloyd G, McCown B. 1982. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings - International Plant Propagators' Society*; 30:421–427.
- McCown BH, Sellmer JC. 1987. General Media and Vessels Suitable for Woody Plant Culture. En: Bonga JM, Durzan DJ, editores. *Cell and Tissue Culture in Forestry*. 24-26. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 4–16 (Forestry Sciences).

- Meiners J, Schwab M, Szankowski I. 2007. Efficient in vitro regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 89(2-3):169–176. doi:10.1007/s11240-007-9230-7.
- Mesa Torres PA. 2015. Algunos aspectos de la fenología, el crecimiento y la producción de dos cultivares de arándano (*Vaccinium corymbosum* L. x *V. darowii*) plantados en Guasca [Tesis]. Cajica, Colombia: Universidad Militar Nueva Granada. 90 p.
- Mohamed G, Khusnetdinova LZ, Timofeeva O. 2018. Elaboration of Micropropagation Protocol for *Vaccinium corymbosum* cv. "Sunt Blue Giant". *Asian Journal of Plant Science and Research*; 8(5):1–11.
- Mora HV. 2010. Organogénesis in vitro de arándano *Vaccinium Corymbosum* L. [Tesis]. Jiquilpan, Mexico: Instituto Politécnico Nacional. 60 p.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*; (15):473–497.
- Ostrolucká MG, Libiaková G, Ondrušková E, Gajdošová A. 2004. In vitro propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis. Biology*; 676:207–212.
- Pritts M, Hancock J, editores. 1992. *Highbush Blueberry Production Guide*. New York, United States: The Northeast Regional Agricultural Engineering Service. 218 p.
- Quispe Ambrocio AC. 2019. Auxinas y citoquinina en la micropropagación de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) de las variedades Biloxi y Misty en Arequipa [Tesis]. Arequipa, Peru: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. 117 p.
- Ribón Barragan AY, Bernal Pérez IJ. 2020. Protocolo de establecimiento in vitro de segmentos nodales de arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.) CV Biloxi [Tesis]. Bogotá, Colombia: Universidad Distrital Francisco José de Caldas.
- Riella A, Tubío M, Lombardo R. 2013. Cadenas Globales y trabajo rural. La producción de arándanos en Uruguay. *Revista de Ciencias Sociales*; 26(32):113–132.
- Rivadeneira MF, Sanchez E. E, Kirschbaum D. S. 2011. Análisis de la cadena agroindustrial arándano y su influencia en el desarrollo territorial extrapampeano. Tucumán, Argentina. 23 p. es.
- Roca WM, Mroginski LA. 1993. *Cultivo de tejidos en la agricultura ; fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 969 p. (CIAT. Publicacion; vol. 151). ISBN: 958-9183-15-8.
- Rocha Granados MdC, López Medina J. 2017. Enraizamiento de arándano (*Vaccinium* sp.) var. Biloxi in vitro. Mexico: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

- Rodríguez Beraud M, Morales Ulloa D. 2015. Effect of explant density and volume of cultivation medium on in-vitro multiplication of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) varieties "Brigitta" and "Legacy". *Revista Scientia Agropecuaria*; 6:31–40. doi:10.17268/sci.agropecu.2015.01.03.
- Romero Torres M. 2020. La segmentación del mercado internacional del arándano en Suecia en 2019 [Tesis]. Callao, Perú: Universidad César Vallejo. 96 p.
- Ross S, Castillo A. 2009. Mass propagation of *Vaccinium corymbosum* in bioreactors. *Agrociencia*; 13(2):1–8.
- Rugini E. 1984. In vitro propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae*. 24(2):123–134. doi:10.1016/0304-4238(84)90143-2.
- 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.
- Schuch MW, Tomaz ZFP. 2019. Advances in the spread of vegetative blueberry. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 41(1). doi:10.1590/0100-29452019041.
- Tecanhuey Fernández LR. 2012. Cultivo in vitro de arándano variedad Biloxi (*Vaccinium Corymbosum* L.): Establecimiento aséptico, balance de fitohormonas y nitrógeno. [Tesis]. Mexico: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 123 p.
- Toro Cano MA. 2009. Mejoramiento del proceso de propagación in vitro de plantas de arándano para las variedades Bluecorp, Duke, y Misty [Tesis]. Santiago, Chile: Universidad de Chile. 38 p.
- Wang Y, Dong X, Huang H-Y, Wang Y-Z. 2019. Establishment of efficient adventitious shoots induction system and ex vitro rooting in *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae). *Botanical Sciences*; 97(2):180–191. doi:10.17129/botsci.2135.