

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

MICROPROPAGACION DE TRES VARIEDADES DE ARANDANO (*Vaccinium ashei* Readel)

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE
LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

ARMANDO JOSE CUTZ TAX

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADO

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2004

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Dr. M. V. Luis Alfonso Leal Monterroso

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO	Dr. Ariel Abderraman Ortíz López
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr. Alfredo Itzep Manuel
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. Manuel de Jesús Martínez Ovalle
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. Erberto Raúl Alfaro Ortiz
VOCAL CUARTO	Prof. Juvencio Chom Canil
VOCAL QUINTO	Prof. Bayron Geovany Gonzalez Chavajay
SECRETARIO	Ing. Agr. Pedro Pelaez Reyes

Guatemala, Noviembre de 2004

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Distinguidos miembros:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración, el trabajo de tesis titulado.

MICROPROPAGACIÓN DE TRES VARIEDADES DE ARÁNDANO (*Vaccinium ashei* Readel)

Presentado como requisito previo a optar el Título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

En espera de su aprobación, me es grato presentarles mi agradecimiento.

Atentamente,

ARMANDO JOSE CUTZ TAX.

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS Por permitirme la vida y ser la fuente de toda sabiduría; Gracias por Todo Dios Mío.

MIS PADRES: Raymundo Mateo Cutz Par

Julia Eulogia Tax de Cutz

Como una muestra de agradecimiento por sus múltiples esfuerzos y sacrificios para mi formación.

MI ESPOSA: Zoilita del Carmen Torres de Cutz,

Por su apoyo incondicional, Paciencia y Amor en el transcurso de mi Carrera Universitaria.

MI HIJA: Julia del Carmen Cutz Torres,

A ti hijita linda con todo Amor y Cariño.

MIS HERMANAS: Nila Cutz de Chávez, Sandra Josefa por todo su esfuerzo y apoyo incondicional en todo el transcurso de mi formación y a mis demás hermanas, Luisa, Florinda, Olivia y que de una u otra manera contribuyeron en mi formación.

MIS CUÑADOS (as): Maco, Margarito, Agustín, Ramón y Emilio,

Con mucho Respeto

MIS SOBRINOS (AS): Con mucho Amor.

FAMILIA EN GENERAL: Con Cariño y Respeto

MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS: José A. Valentín, José R. Aspuac, Estuardo López, Carlos Ordóñez, Aníbal Mexicanos, Max Ortiz, Nadia Espinosa, Flor de María y Mayra Gonzáles, por las experiencias compartidas en el transcurso de esta etapa Universitaria.

TESIS QUE DEDICO

A:

DIOS

GUATEMALA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Por seguir proveyendo al País Profesionales

FACULTAD DE AGRONOMIA

Por ser grande entre las grandes

MIS ASESORES:

Ing. Agr. Ms. Héctor Alfredo Sagastume Mena

Ing. Agr. Ms. Domingo Amador Pérez

AL INSTITUTO NORMAL PARA VARONES DE OCCIDENTE, (INVO) QUETZALTENANGO

TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE CONTRIBUYERON EN MI FORMACION.

AGRADECIMIENTOS

A:

MIS ASESORES: Ing. Agr. Ms. Héctor Alfredo Sagastume Mena

 Ing. Agr. Ms. Domingo Amador Pérez

Por su incondicional aporte para la realización y orientación de la presente investigación en bien de la educación

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
AGRICOLAS, (ICTA) VILLA NUEVA

Por abrirme sus puertas y los recursos invertidos en la realización de la presente investigación

INGENIO MADRE TIERRA, SANTA LUCIA COTZUMALGUAPA

Por abrirme sus puertas y los recursos invertidos en la realización del Ejercicio Profesional supervisado de Agronomía

PERSONAL TECNICO Y ADMINISTRATIVO DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DEL
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA AGRICOLAS (ICTA).

PERSONAL TECNICO Y ADMINISTRATIVO DE LA ZONA – 3 DEL INGENIO MADRE TIERRA
Ing. Agr, Cesar Castillo, Mayordomos, Planilleros, Caporales y ayudantes por su apoyo incondicional en el transcurso del Ejercicio Profesional Supervisado de Agronomía.

INDICE GENERAL

	Página
INDICE GENERAL	i
INDICE DE CUADROS	iii
INDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	xiii
1. INTRODUCCION	1
2. DEFINICION DEL PROBLEMA	2
3. MARCO TEORICO	3
3.1. Marco teórico conceptual.....	3
3.1.1. Descripción del cultivo.....	3
3.1.2. Clasificación taxonómica del arándano.....	3
3.1.3. Partes de la planta de arándano.....	4
3.1.4. Requerimientos edafoclimáticos del arándano.....	4
3.1.5. Propagación del arándano.....	5
3.1.6. Ciclo el cultivo de arándano.....	5
3.1.7. Importancia económica y distribución geográfica del arándano.....	6
3.1.8. Épocas de producción.....	6
3.1.9. Manejo del cultivo.....	6
3.1.10. Costos de producción.....	8
3.1.11. Valor nutricional del fruto de arándano.....	8
3.1.12. Utilidad del arándano.....	9
3.1.13. Productores de arándano en Guatemala.....	9
3.1.14. Cultivo de tejidos vegetales.....	9
3.1.15. Medios de cultivo.....	18
3.1.16. Condiciones ambientales para la incubación.....	30
3.1.17. Regeneración de plantas en cultivo de tejidos.....	30
3.1.18. Oscurecimiento oxidativo.....	31
3.2. Marco referencial.....	32
3.2.1. Cultivo de tejidos del arándano.....	32
4. OBJETIVOS	33
4.1. General.....	33

4.2. Específicos.....	33
5. HIPOTESIS.....	34
6. METODOLOGÍA.....	35
6.1. Área experimental.....	35
6.2. Material experimental.....	35
6.3. Selección de las dosis de 2iP (2 isopentenilaminopurina).....	35
6.4. Preparación del medio de cultivo.....	36
6.5. Micropropagación.....	37
6.6. Experimento I.....	38
6.6.1. Micropropagación utilizando hojas como explante.....	38
6.7. Experimento "II".....	40
6.7.1. Micropropagación utilizando microesquejes como explantes.....	40
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
7.1. Experimento I.....	42
7.1.1. Altura de planta.....	42
7.1.2. Número de hojas.....	47
7.1.3. Número de entrenudos.....	49
7.1.4. Número de plantas regeneradas.....	53
7.1.5. Tasa de Propagación.....	55
7.2. Experimento II.....	61
7.2.1. Altura de planta.....	61
7.2.2. Número de hojas.....	63
7.2.3. Número de entrenudos.....	64
7.2.4. Número de plantas regeneradas.....	66
7.2.5. Tasa de propagación.....	69
8. CONCLUSIONES.....	70
9. RECOMENDACIONES.....	72
10. BIBLIOGRAFÍA.....	73
11. ANEXOS.....	75

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Ciclo del cultivo de arándano.....	6
Cuadro 2. Valor nutricional del fruto del arándano.....	8
Cuadro 3. Arreglo combinatorio de los tratamientos utilizando hojas como explantes.....	38
Cuadro 4. Altura de planta (cm) de tres variedades de arándano según dosis de 2iP.....	42
Cuadro 5. Análisis de varianza para la variable altura de planta.....	43
Cuadro 6. Prueba de Tukey para la separación de medias entre variedades.....	43
Cuadro 7. Prueba de Tukey para la separación de medias entre dosis de 2iP.....	44
Cuadro 8. ANDEVA para la regresión entre dosis de 2iP y altura de planta.....	45
Cuadro 9. Parámetros estimados para la regresión entre dosis de 2iP y altura de planta..	45
Cuadro 10. Número de hojas de tres variedades de arándano según dosis de 2iP.....	47
Cuadro 11. Análisis de varianza para la variable número de hojas.....	48
Cuadro 12. Resultados de laboratorio del número promedio de entrenudos de las tres variedades de arándano según dosis de 2iP.....	50
Cuadro 13. Análisis de varianza para la variable número de entrenudos.....	51
Cuadro 14. Resultados de laboratorio del número promedio de plantas regeneradas.....	53
Cuadro 15. Análisis de varianza para la variable número de plantas regeneradas.....	54
Cuadro 16. Número de plantas potenciales, según tasa de propagación y dosis de 2iP, utilizando hojas como explantes y diferentes intervalos entre propagaciones, para la variedad Woodard.....	56
Cuadro 17. Número de plantas potenciales, según tasa de propagación y dosis de 2iP, utilizando hojas como explantes y diferentes intervalos entre propagaciones, para la variedad Climax.....	57
Cuadro 18. Número de plantas potenciales, según tasa de propagación y dosis de 2iP, utilizando hojas como explantes y diferentes intervalos entre propagaciones, para la variedad Tifblue.....	58
Cuadro 19. Resultados de laboratorio para la variable altura de planta utilizando microesquejes como explantes, sin reguladores del crecimiento.....	61
Cuadro 20. Análisis de varianza para la variable altura de planta.....	62
Cuadro 21. Prueba de Duncan para la separación de medias de altura de planta entre variedades.....	62

Cuadro 22. Resultados de laboratorio para la variable de respuesta número de hojas utilizando microesquejes como explante, sin reguladores del crecimiento.....	63
Cuadro 23. Análisis de varianza para la variable número de hojas.....	64
Cuadro 24. Prueba de Duncan para la separación de medias entre variedades, para la variable número de hojas.....	64
Cuadro 25. Resultados de laboratorio de la variable número de entrenudos, utilizando microesquejes como explante, sin reguladores del crecimiento.....	65
Cuadro 26. Análisis de varianza para la variable número de entrenudos.....	65
Cuadro 27. Prueba de Duncan para la separación de medias entre variedades, para la variable de respuesta número de entrenudos.....	66
Cuadro 28. Resultados de laboratorio de la variable número de plantas regeneradas, utilizando microesquejes como explantes, sin reguladores del crecimiento.....	67
Cuadro 29. Análisis de varianza para la variable número de plantas regeneradas.....	68
Cuadro 30. Prueba de Duncan para la separación de medias entre variedades, para la variable número de plantas regeneradas, utilizando microesquejes como explantes, sin reguladores del crecimiento.....	68
Cuadro 31. Número de plantas potenciales, utilizando microesquejes como explantes, sin reguladores del crecimiento y diferentes intervalos entre propagaciones.....	69
Cuadro 32A. Medio de cultivo WPM (Woody Plant Media) de Lloyd y M ^c Cown (1981).....	78
Cuadro 33A. Costo estimado de un litro de medio de cultivo WPM, según dosis de 2iP....	79

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Flujograma de la preparación de las soluciones madre y los medios de cultivo..	36
Figura 2. Flujograma de los experimentos empleados para la micropropagación del arándano.....	38
Figura 3. Valores observados (color rojo) y regresión lineal simple (azul) entre dosis de 2iP y altura de planta.....	46
Figura 4. Interacción variedad por dosis de 2iP, para la variable número de hojas.....	49
Figura 5. Interacción variedad por dosis de 2iP, para la variable número de entrenudos...	52
Figura 6. Interacción variedad por dosis de 2iP, para la variable número de plantas regeneradas.....	55
Figura 7. Número de plantas potenciales que se pueden producir utilizando la mejor dosis de 2iP para cada variedad.....	59
Figura 8. Regresión exponencial, para la variable tasa de propagación, utilizando la mejor dosis de 2iP para cada variedad.....	60

**MICROPROPAGACION DE TRES VARIEDADES
DE ARÁNDANO (*Vaccinium ashei* Readel)**

**MICROPROPAGATION OF THREE BLUEBERRY
(*Vaccinium ashei* Readel) VARIETIES**

RESUMEN

El arándano (*Vaccinium ashei* Readel) es un arbusto de porte erecto, con algunos tallos rastreros, que llegan a medir desde 0.3 a 4.5 m, de altura y de una vida larga (40 años) (1). Sus frutos comestibles son bayas redondas umbilicales de 7 a 15 mm, de diámetro, que del color verde pasa al rojo y de este al color azul oscuro, cubiertos de un polvo blanco y presenta pequeñas semillas. Los frutos poseen un sabor agridulce. Es también conocido como "blueberry". Conforman el grupo de los frutos denominados comercialmente en el ámbito internacional como "berries" entre los que, además, se encuentran la frambuesa, mora y otros (22). Los "berries" constituyen un grupo de especies nativas principalmente del hemisferio norte que pertenece al género *Vaccinium* de la familia de las Ericaceas. El arándano representa una de las especies de más reciente domesticación, su mejoramiento genético se inició en 1940. Es una especie resistente a pH alcalino, resistente a la sequía, de alta producción y fruta factible de conservación en postcosecha. El período de desarrollo del fruto puede llegar de 90 a 120 días (1).

Entre las nuevas alternativas de producción frutícola más viables, orientadas a la exportación, para Guatemala, en función del mercado, rentabilidad y disponibilidad de recursos climáticos necesarios para su cultivo, se destaca el arándano (7).

La propagación convencional del arándano es ineficiente debido a que produce pocos hijos por planta madre, por lo que la producción de nuevas plantas requiere mucho tiempo (2 años) (11). En Guatemala se han realizado algunas investigaciones preliminares tendientes, principalmente, al establecimiento *in vitro* del arándano utilizando brotes axilares como explantes, pero no se han realizado pruebas a nivel de laboratorio sobre la propagación del arándano

utilizando hojas y microequejes como explantes iniciales y tampoco se tenía conocimiento del efecto del regulador de crecimiento 2iP (2-isopentenilaminopurina) sobre dichos explantes, en las variedades que interesan a los productores (15).

En esta investigación se utilizaron las variedades de arándano: Woodard, Climax y Tifblue, provenientes de cultivo *in vitro* en el laboratorio de Biotecnología del ICTA en Bárcena, Villa Nueva. Se evaluaron cinco dosis de 2iP, que fueron las siguientes: 3, 4, 5, 6 y 7 mg/l, debido a que existían referencias de trabajos realizados en arándano tipo “ojo de conejo” (*Vaccinium ashei* Readell) en otros países (Zimmerman y Roone, 1980) (24), que utilizaron dosis de 5, 10, 15 y 20 mg/l de 2iP, utilizando hojas como explante en la variedad “berkeley”. Así también Robles (2003) (15), realizó una investigación de micropropagación del arándano utilizando brotes axilares como explantes y usando dosis de 2iP de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/l.

Entre las principales conclusiones del trabajo se pueden mencionar las siguientes: a) la dosis de cero miligramos por litro de 2iP (2 isopentenilaminopuerina) fue la que produjo la mayor altura de planta (5.83, 5.33, 4.27 centímetros, para las variedades Climax, Woodard y Tifblue, respectivamente). Mayor número de hojas (13, 9.0 y 7.27 hojas) y mayor número de entrenudos (9.9, 7.87 y 7.0 entrenudos), b) la dosis de 2iP que produjo mayor número de plantas regeneradas, para la variedad Climax, fue tres miligramos por litro, a través de la propagación por hojas, con un promedio de 3.9 de plantas, c) la mayor tasa de propagación, en la variedad Climax, se obtuvo con la dosis cinco miligramos por litro de 2iP, a través de la propagación por hojas, con una cantidad estimada de producción de 1,340,096 plantas anuales, propagando cada dos meses, utilizando la regresión exponencial $y = 2 e^{0.6931x}$ se puede estimar, en función del tiempo, cuantas plantas se pueden obtener a lo largo de un año.

Se recomienda, para una óptima propagación *in vitro* de cada una de las variedades, lo siguiente: para la variedad Climax, utilizar 5 mg/l de 2iP; para la variedad Woodard, utilizar 6 mg/l de 2iP; y, por último, para la variedad Tifblue, utilizar 3 mg/l de 2iP.

1. INTRODUCCION

Entre las nuevas alternativas de producción frutícola más viables, orientadas a la exportación, para Guatemala, en función del mercado, rentabilidad y disponibilidad de recursos climáticos necesarios para su cultivo, se destaca el arándano (*Vaccinium ashei* Readel).

El arándano es un arbusto de porte erecto, con algunos tallos rastreros, que llegan a medir desde 0.3 a 4.5 m, de altura y de una vida larga (40 años) (1). Sus frutos comestibles son bayas redondas umbilicales de 7 a 15 mm, de diámetro, que del color verde pasa al rojo y de este al color azul oscuro, cubiertos de un polvo blanco y presenta pequeñas semillas, los frutos poseen un sabor agridulce. Es también conocido como "blueberry". Conforman el grupo de los frutos denominados comercialmente en el ámbito internacional como "berries" entre los que, además, se encuentran la frambuesa, mora y otros (22). Los "berries" constituyen un grupo de especies nativas, principalmente del hemisferio norte, que pertenece al género *Vaccinium* de la familia de las Ericaceas. El arándano representa una de las especies de más reciente domesticación, su mejoramiento genético se inició en 1940. Es una especie resistente a pH alcalino y a la sequía, de alta producción y fruta factible de conservación en postcosecha. El período de desarrollo del fruto puede llegar de 90 a 120 días (1).

La propagación convencional del arándano es ineficiente debido a que produce pocos hijos por planta madre, por lo que la producción de nuevas plantas requiere mucho tiempo (11). Una alternativa de propagación la constituye la propagación *in vitro*. A nivel internacional se han generado investigaciones sobre la micropropagación del arándano, sin embargo, se utilizaron variedades que no se cultivan en Guatemala, por lo que su utilidad es parcial (24). A nivel nacional, únicamente se ha trabajado en el establecimiento *in vitro* del arándano utilizando brotes axilares como explantes, por lo que es importante investigar más a fondo sobre la propagación del arándano, especialmente utilizando hojas y microestacas como explantes iniciales, y con las variedades que interesan a los productores nacionales (15).

El principal objetivo de la presente investigación fue contribuir con el desarrollo de una metodología que permita la propagación *in vitro* del arándano.

2. DEFINICION DEL PROBLEMA

El método tradicional de propagación es ineficiente, ocupa mucho espacio y produce pocas plantas por unidad de área, por lo que la producción de nuevas plantas requiere mucho tiempo (2 años) (11).

En países desarrollados han generado información sobre la propagación *in vitro* del arándano, sin embargo, esta fue generada para variedades que no se cultivan en Guatemala, por lo que su utilidad es solamente parcial, es decir, sirve de base para generar la información propia (24).

En Guatemala se han realizado algunas investigaciones preliminares tendientes, principalmente, al establecimiento *in vitro* del arándano utilizando brotes axilares como explantes, - pero no se han realizado pruebas a nivel de laboratorio sobre la propagación del arándano utilizando hojas y microestacas como explantes iniciales y tampoco se tenía conocimiento del efecto del regulador de crecimiento 2iP (2-isopentenilaminopurina) sobre dichos explantes, en las variedades que interesan a los productores nacionales (15).

Tomando en cuenta este problema se consideró importante realizar esta investigación, con la cual se pretendió generar información que permitiera una alternativa de propagación eficiente, rápida, económica y en poco espacio.

3. MARCO TEORICO

3.1 Marco teórico conceptual

3.1.1. Descripción del cultivo

El arándano pertenece a la familia Ericaceae. A esta familia de plantas, los botánicos les han estimado una edad de más de 13,000 años (1).

El arándano se cultiva por sus frutos comestibles, de los que se pueden hacer bebidas alcohólicas, helados, pasteles, etc. Es jugoso, de sabor dulce subácido. Sus frutos, al madurar, están cubiertos de un polvo blanco insoluble en el agua, que le hace tomar un tinte azul-celeste (1).

Los arándanos azules tienen más que ofrecer que tan sólo buen sabor y presentación, conteniendo una buena fuente de vitamina C y fibra. Los frutos de arándanos no contienen colesterol o grasas y son bajos en calorías (11).

3.1.2. Clasificación taxonómica del arándano

De acuerdo con Cronquist (5) taxonómicamente el arándano se clasifica de la siguiente manera:

Reino:	Vegetal
División:	Pterophytas
Subdivisión:	Angiosperma
Clase:	Dicotiledónea
Subclase:	Dilleniidae
Orden:	Ericales
Familia:	Ericaceae
Subfamilia:	Vaccinioideae
Tribu:	Vaccinieae
Género:	<i>Vaccinium</i>
Especie:	<i>Vaccinium ashei</i> Readell

3.1.3. Partes de la planta de arándano (1).

- a) **Hojas:** son alternas y dentadas, con pecíolos cortos.
- b) **Flores:** son péndulas y se abren solitarias en la axila de las hojas. El cáliz, poco marcado, tiene cuatro o cinco dientes obtusos. La corola, esférica, verde pálido, deja sobresalir el estigma.
- c) **Raíces:** bajo tierra desarrolla una red de raíces superficiales y retoños rastreros, dando origen a cepas rectas, cuadrangulares, muy ramificadas, cuya parte más vieja está recubierta por una fina corteza gris.

3.1.4. Requerimientos edafoclimáticos del arándano (19).

- A. Hábitat:** se distribuye en la mayor parte de Europa (Alpes, Apeninos Centrales, Pirineos), Asia, América Central, EE.UU. y Canadá, entre los bosques de coníferas, y es una planta importante, desde el punto de vista ecológico, no sólo por sus frutos sino porque, además, protege el suelo de los bosques de la erosión y contribuye a la formación de humus.
- B. Clima:** se adapta a regiones de climas fríos y templados. Hasta fechas recientes, la mayor parte del arándano azul se cosechaba de plantas silvestres. Sin embargo, como resultado de investigaciones, se dispone actualmente de plantas de variedades excelentes para plantaciones comerciales, tanto del tipo mata alta como del tipo “ojo de conejo”. Por lo general, el arándano azul de mata alta tiene exigencias de frío invernal comparativamente altas (más o menos las mismas que el durazno) y requiere un suelo continuamente húmedo, mientras que el arándano azul “ojo de conejo” tiene exigencias de frío invernal comparativamente cortas y se desarrolla bien en suelos secos. Este cultivo requiere de las condiciones climáticas siguientes, para su óptimo desarrollo: temperaturas que varíen de 5 a 18 °C, hay unas variedades que requieren 650 horas por debajo de 7 °C y las variedades del tipo “ojo de conejo” necesitan menos. Los rangos de precipitación pluvial pueden oscilar de los 1,000 a los 3,000 mm anuales bien distribuidas durante el período vegetativo. Es una planta muy susceptible a los encharcamientos por el crecimiento superficial de sus raíces.

C. Suelos: el arándano azul es muy exigente en cuanto a requerimientos de suelo. Requiere de suelos ácidos, franco arenosos y franco arcillosos, con alto contenido de materia orgánica, bien drenados, que fundamentalmente no retengan el agua, anegándose por períodos prolongados. El pH requerido es de alrededor de 3.8 a 5.8, o incluso hasta seis si las demás condiciones son óptimas, con un óptimo de 4.4. Los suelos deben ser poco profundos (40 cm de profundidad efectiva).

3.1.5. Propagación del arándano

La propagación del arándano se consigue por semillas, hijuelos, estaquillado y micropropagación. La propagación por semilla es el método empleado en la investigación de nuevas variedades. Por estaquillado su éxito es limitado debido al bajo rendimiento en el enraizamiento. La micropropagación es la técnica de mayor éxito y la más empleada, de manera distinta según la especie y la variedad. Su principal ventaja es que el material vegetal está libre de enfermedades aunque su inconveniente es su elevado costo (1).

Una vez enraizado, el material vegetal se transplanta a bolsas de plástico, cultivándose de la misma forma que las estaquillas durante un periodo de uno a dos años. Los laboratorios especializados se dedican a la micropropagación de plantas madre con certificación varietal y sanitaria (19).

3.1.6. Ciclo del cultivo de arándano

A continuación se describe el ciclo del cultivo de arándano, tanto del arándano alto (“Highbush”) como el arándano de porte pequeño (“Rabbiteye”) (cuadro 1).

Cuadro 1. Ciclo del cultivo de arándano

1 a 2 años	Crecimiento y desarrollo.
3 a 4 años	Primeras cosechas.
7 años	Estabilización de la cosecha.
8 a 30 años	Adulto productivo.
90 días	Período de floración variedad tipo Higbush.
90 a 120 días	Período de floración variedad tipo “ojo de conejo” (“Rabbiteye”)

Fuente: AGEXPRONT (2001) (22).

3.1.7. Importancia económica y distribución geográfica del arándano

Los frutos silvestres siempre han sido apreciados por el hombre, pero actualmente ha crecido su interés, por un lado, debido a su origen natural y por estar de moda su consumo. El arándano se ha obtenido de plantas silvestres, pero, en los últimos años, es cuando se ha empezado a cultivar (19).

Canadá es el principal proveedor de arándanos congelados del mundo, pero, a diferencia de EEUU, la producción canadiense es mayoritariamente de tipo silvestre (11).

3.1.8. Épocas de producción

La época de producción para Guatemala va de diciembre a febrero. El riego es apropiado para la producción del arándano, dependiendo de ciertas circunstancias tales como: condiciones de suelo, sitio, disponibilidad, fuentes de agua y costos de inversión (19).

3.1.9. Manejo del cultivo (1).

A. Distancia de siembra: la distancia es de tres metros entre surcos, 1.2 a 1.5 metros entre plantas. La densidad de plantación es de 2,000 a 2,500 plantas por hectárea.

B. Cobertura: se aplica una cobertura plástica para los primeros años de desarrollo y después se cubre con corteza de pino para mantener la humedad del suelo.

- C. Riego:** el agua de riego debe ser de buena calidad, sin presentar salinidad ni exceso de calcio, boro o cloro.
- D. Eliminación de malezas:** para evitar la competencia hídrica y nutricional se deben eliminar las malas hierbas con herbicidas sistémicos o de contacto, o de forma mecánica, teniendo en cuenta que el sistema radicular del arándano es superficial.
- E. Recolección:** es necesario el empleo de mano de obra especializada ya que se realiza de forma manual para el posterior envasado y embalaje. Esta práctica se realiza de forma selectiva según los índices de madurez del fruto, que son el color y el tamaño, e implica que se realicen hasta ocho recolecciones por planta. La recolección mecanizada se emplea cuando el fruto se destina a la industria.
- F. Almacenamiento:** se recomienda almacenar el arándano fresco en cámaras frigoríficas, con una temperatura entre -0.6 y 0°C y humedad relativa del 95%, para que pueda llegar a alcanzar una vida útil entre 14 y 28 días.
- G. Transporte:** se realiza por vía aérea o en atmósfera controlada si es por vía marítima.
- H. Presentación:** el arándano fresco se presenta en el mercado en cubetas PET reciclables, llamadas "clamshells", de 70 gramos, si su destino es EEUU, y de 125 gramos si es para los mercados europeos.
- I. Calidad:** las normas de calidad están tipificadas por el Código Federal de Regulaciones de los EEUU en: U.S. No.1, U.S. No.2, U.S. No.3 y Unclassified. La de mayor calidad es la U.S. No.1, donde las características a tener en cuenta son: la uniformidad del tamaño, color, madurez y ausencia de daños.

3.1.10. Costos de producción

Los costos de producción en el cultivo de arándanos oscilan alrededor de US\$ 63,773.16 por hectárea, en un período de siete años. Con relación a la productividad del cultivo en el mismo período, puede producir 32.5 TM/ha. Si se toma en cuenta todos estos factores para calcular el costo aproximado, es posible inferir que cada tonelada métrica será producida a un costo de US\$ 4,186.84, arrojando una rentabilidad de 45.68 % (19).

3.1.11. Valor nutricional del fruto de arándano

El valor nutricional del arándano, contenido por 100 gramos de fruto, puede variar dependiendo de la variedad (cuadro 2).

Cuadro 2. Valor nutricional del fruto del arándano

Agua	87.4 g.
Proteínas	0.3 g.
Fibras	1.7 g.
Calorías	42 kcal.
Vitamina A	30 UI
Vitamina B1	0.014 mg.
Vitamina B2	0.0024 mg.
Vitamina B6	0.012 mg.
Vitamina C	12 mg.
Ácido nicotínico	0.2 mg.
Ácido pantoténico	12 mg.
Sodio	2 mg.
Potasio	72 mg.
Calcio	14 mg.
Magnesio	6 mg.
Manganeso	0.5 mg.
Hierro	0.5 mg.
Cobre	0.26 mg.
Fósforo	10 mg.
Cloro	4 mg.

Fuente: AGROBIT (2002) (1).

3.1.12. Utilidad del arándano

- A. Culinarias:** en la industria conservera tiene un papel cada vez más importante, su transformación en mermelada, así como ingrediente de bebidas alcohólicas y sobre todo como colorante. Debido al jugo de su pulpa, se acompaña muy bien en platos de casa, en la confección de salsas de cocina. El fruto puede transformarse en jaleas y confituras, siendo relleno de tartas y pasteles (1).
- B. Medicinales:** como su contenido en calorías es muy bajo tiene gran importancia en las dietas, reducen el azúcar en la sangre y tiene propiedades antiinflamatorias. Curan inflamaciones bucales (dejándolos macerar y preparando un gargarismo) debido a sus propiedades desinfectantes. Secos combaten las diarreas y frescos tienen propiedades laxantes. También se emplean para disminuir el efecto de la miopía (1).

3.1.13. Productores de arándano en Guatemala

En la actualidad se encuentran sembradas 5.6 hectáreas de arándano, aproximadamente, en la región de San Juan Chamelco, Alta Verapaz, de las cuales se encuentra en producción solamente 0.70 hectáreas. Uno de los agricultores impulsores del cultivo de arándano en Guatemala se llama Bob Makranski, él mismo posee un promedio de 50 variedades de las especies de arándano “alto” y “ojo de conejo”. Sus parcelas experimentales tienen plantas de hasta 14 años de edad, por lo que posee una gran experiencia en el cultivo de arándano en Guatemala. Otro de los impulsores del cultivo es Felipe Yurrita, esta persona a logrado llevar a cabo un manejo agronómico con bastante éxito y posee la mayor área sembrada del cultivo. Ellos, conjuntamente con otros dos agricultores más, conforman la representación de los agricultores de arándano en el país y agremiados a la AGEXPRONT (15).

3.1.14. Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales abarca un grupo de técnicas que consisten en aislar y cultivar ciertas partes de la planta (explante) como células, tejidos y órganos, en condiciones físicas y químicas artificiales para que expresen su capacidad morfológica. Es necesario también considerar el cultivo y manipulación del explante, bajo condiciones de asepsia, que eviten la

contaminación microbiana. En la naturaleza las plantas poseen la capacidad de reproducirse vegetativamente, estos mismos factores que dan inicio al crecimiento y a la multiplicación naturalmente están involucrados en el cultivo de tejidos. La característica de la totipotencia de las células vegetales, es decir, la capacidad de desarrollar una nueva planta completa, es el principio de la multiplicación *in vitro*, aunque de manera más eficiente, ya que se le proporciona un ambiente artificial favorable para el desarrollo de la planta (2).

A. Fases del cultivo de tejidos vegetales

El proceso de cultivo de tejidos incluye cinco fases que son: (16).

- a. Fase I. Preparación de la planta madre:** para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre un período de tiempo, que puede oscilar entre unas semanas o varios meses, en un invernadero, en el que se va a intentar cultivar la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición, del fotoperíodo y de la radiación recibida.
- b. Fase II. Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia:** una vez escogida la planta madre, se extraen los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Antes de extraer los explantes se hace una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia. Ya en condiciones de asepsia (se trabaja en cámaras de flujo laminar) se extraen los explantes del material vegetal y se ponen en cultivo en un medio de iniciación dentro de un tubo de cultivo, para poder controlar la sanidad y la viabilidad de los explantes.
- c. Fase III. Multiplicación de los brotes:** durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron de la Fase I originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varios entrenudos. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar.

d. Fase IV. Enraizamiento.

1. **Enraizamiento *in vitro*:** se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que sólo contenga auxinas. Esta operación se realiza en la cámara de flujo laminar. Este método permite ser más flexible a la hora de escoger los brotes, ya que estos obtienen del medio la fuente de energía para enraizar, y por lo tanto no es necesario que tengan las hojas muy bien desarrolladas para realizar la fotosíntesis.
2. **Enraizamiento *ex vitro*:** los explantes se deben transferir a un sustrato limpio, aunque no necesariamente estéril. Con este método es necesario que el medio de enraizamiento esté libre de organismos patógenos y que los brotes tengan las hojas bien desarrolladas, ya que deben realizar fotosíntesis para que la planta tenga una fuente de energía para enraizar y desarrollarse. Los explantes deben de plantarse en contenedores cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada, y hacerlos enraizar en el laboratorio o ponerlos dentro de un invernadero en un área sombreada.
3. **Fase V. Aclimatación:** los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. Tanto si los explantes fueron enraizados *in vitro* como *ex vitro*, en el momento en que se extraen los explantes de los recipientes de enraizamiento están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas adaptados a ese ambiente y les dificulta adaptarse al descenso de la humedad relativa, por lo que resultan ser demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula cerosa bien desarrollada, que sirve de barrera para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta. Los explantes deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz.

B. Principales técnicas del cultivo de tejidos vegetales (18).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales se pueden dividir en dos tipos que son:

- a. **Cultivo de tejidos no organizados.** Dentro de las técnicas de cultivo de tejidos no organizados se pueden mencionar las siguientes: cultivo de callos, cultivos en suspensión (o células), cultivo de protoplastos y cultivo de anteras.
- b. **Cultivo de estructuras organizadas.** Dentro de las técnicas de cultivo de estructuras organizadas se pueden mencionar las siguientes: cultivo de meristemos, cultivo de brotes o ápices de brotes, cultivo de nudos, cultivo de embriones y cultivo de raíces aisladas.

Dentro de los objetivos de este conjunto de técnicas están: la micropropagación masiva, el mejoramiento genético y la producción de metabolitos secundarios. La mayoría de las veces enfocados a especies de interés económico. Con la micropropagación masiva se aumenta la tasa de propagación, normalmente se eliminan diversas enfermedades en el proceso, lo cual facilita la producción y la calidad de las plantas. Esta técnica se puede desarrollar en cualquier época del año y/o medio ambiente, logrando planificar la producción de acuerdo a la demanda. En general, existen tres formas de regeneración vegetal, generalmente mediante organogénesis o embriogénesis. El cultivo de meristemos y ápices de brotes, que permite la proliferación de brotes es considerado como un método seleccionado para la propagación masiva *in vitro* la rapidez. El tiempo y el espacio de almacenamiento y el mayor potencial de producción vegetal son algunas de sus ventajas sobre los métodos convencionales. De acuerdo a estos objetivos las aplicaciones de estas técnicas resultan de interés en diferentes campos de investigación. Dentro de los programas de mejoramiento se considera la conservación de germoplasma *in vitro* y su disponibilidad para desarrollar estudios. El incremento de viabilidad genética para fines de selección, tales como: la obtención de variantes somaclonales y plantas transformadas vía ingeniería genética. La introducción de genes de interés lograda a través de polinización *in vitro*, cultivo de embriones, fusión de protoplastos, etc. La aceleración de dichos programas mediante la germinación de semillas y cultivo de frutos *in vitro*, la clonación de genotipos para pruebas de capacidad de combinación, cultivo de anteras y microsporas para obtención de haploide y la multiplicación de genotipos superiores y recuperación de plantas libres de virus. La aplicabilidad

del cultivo de tejidos vegetales en la fitopatología se enfoca en estudios de la relación patógeno-hospedero, recuperación de plantas libres de virus y otros agentes causales de patógenos para fines de investigación, como en el caso de nemátodos. El cultivo de tejidos vegetales tiene diversas aplicaciones que van desde estudios básicos sobre los procesos bioquímicos y morfológicos de la diferenciación celular hasta investigaciones aplicadas al desarrollo de tecnologías para obtención de plantas mejoradas genéticamente, propagación clonal y producción de metabolitos secundarios con fines industriales.

C. Establecimiento de cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos comprende una serie de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de la planta) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (luminosidad, humedad y temperatura). Sin embargo, para lograr el establecimiento de los cultivos de tejidos, es decir, la separación del explante y las operaciones relacionadas con su incubación *in vitro*, es necesario considerar en gran medida el tipo de explante a utilizar, así como el sistema de cultivo que se emplee. Debido a que las técnicas que se utilizan difieren según el tejido a cultivar, no se emplean las mismas técnicas para el cultivo de protoplastos que para el cultivo de meristemas, ya que también el logro de los objetivos no se alcanzará igual para las dos técnicas (21).

Para establecer el cultivo de células, tejidos u órganos *in vitro* se siguen una serie de principios básicos. Primeramente es necesario seleccionar y separar de la planta el material que se desea cultivar. El siguiente paso a considerar consiste en eliminar los microorganismos que se encuentran contaminando el material vegetal. Por último, se debe proporcionar al explante un ambiente apropiado a través de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuadas. Tanto asepsia como la inoculación del material vegetal se lleva a cabo en un ambiente estéril. Tomando en cuenta estos principios básicos para el establecimiento de los cultivos se consideran los siguientes aspectos:

- a. El explante.
- b. Las normas de asepsia.
- c. Los medios de cultivo.

Las condiciones ambientales de incubación y la interacción de estos factores determinarán la respuesta que se obtengan del cultivo *in vitro* (21).

D. Factores que influyen en la micropropagación

- a. **El explante:** los cultivos *in vitro* pueden iniciarse prácticamente de cualquier parte de la planta. Sin embargo, la elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos. Dicha elección dependerá del objetivo que se desea alcanzar, de la especie vegetal y del sistema de cultivo a utilizar (21). Es recomendable comparar sistemáticamente varias fuentes de células, tejidos u órganos antes de decidirse por alguno de ellos. Generalmente se aconseja utilizar plantas sanas y vigorosas como fuente de explante. Se seleccionan aquellas partes de la planta que se encuentran en división activa, como las regiones meristemáticas. El éxito del cultivo de tejidos disminuye con el aumento de la edad de la planta que da el explante (21). Se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis, ya que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas de diferentes edades fisiológicas, mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro*. En este sentido los meristemos apicales y axilares han sido empleados con éxito en una amplia gama de especies. El tipo de planta es determinante para el éxito de los cultivo *in vitro*, por ejemplo, los tejido de las gimnospermas son más difíciles de cultivar que los de las angiospermas. De estas últimas el material derivado de las dicotiledóneas puede ser cultivado con mayor facilidad que el de las monocotiledóneas (21). Para la obtención de callo, tejido desorganizado, es posible utilizar una gran gama de explantes. Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos, por ejemplo, en el caso de las dicotiledóneas herbáceas se puede lograr la proliferación callosa con relativa facilidad a partir de ápices o meristemos caulinares, hojas, entrenudos,

cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos. La elección se complica si a partir del callo se desea obtener una nueva planta, ya que son pocas las especies que tienen la característica de permitir el uso de una gran variedad de explantes para producir callos capaces de regenerar plantas enteras. Entre algunas de estas especies están el tabaco (*Nicotiana tabacum*), zanahoria (*Daucus carota*), entre otros. En el caso de vegetales en los cuales la obtención de callos no está limitada por el tipo de explante, este se seleccionará por razones prácticas tales como disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación con microorganismos y rápida respuesta *in vitro* (21). El establecimiento de cultivos que persiguen determinados objetivos limita aún más la elección del explante. Para la obtención de haploides se cultivan anteras, inflorescencias, microsporas u ovarios. Para lograr plantas libres de patógenos o para la conservación de germoplasma se cultivan meristemas (sin primordios foliares). Si se desea la micropropagación de plantas que se reproducen por semillas se pueden utilizar como explantes las partes embrionales o de la plántula. Las semillas se pueden desinfectar superficialmente y germinar en condiciones asépticas. Este método se usa extensivamente en coníferas y otras especies maderables. En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos son los que utilizan como fuente de explante (4). El tamaño del explante es otro factor a considerar en el establecimiento del cultivo *in vitro*. A mayor tamaño se facilita la proliferación callosa, pero también aumentan las posibilidades de heterogeneidad y de contaminación por microorganismos. Sin embargo, existe un tamaño mínimo del explante que varía según la especie vegetal, por debajo del cual no se obtiene respuesta (4). La variabilidad asociada al genotipo de la especie vegetal a utilizar influye en la respuesta *in vitro* que se obtiene, es frecuente que en idénticas condiciones de medio y ambiente la respuesta de determinado explante de una especie difiera con el cultivar empleado. Ligeros cambios en la composición de los medios de cultivo, especialmente en cuanto a los reguladores de crecimiento, pueden ser de utilidad para obviar ese efecto del genotipo del material vegetal (4). Aparte de los aspectos mencionados también resulta importante tomar en cuenta la época del año en que se realizan los cultivos y de colecta del material, especialmente cuando los explantes se obtienen de plantas de invernadero o del campo. Finalmente, se deben considerar los pretratamientos a los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes (21).

b. Normas de asepsia: las plantas generalmente se encuentran contaminadas por microorganismos que no son patógenos bajo condiciones normales. Sin embargo, cuando el tejido o el órgano es cultivado *in vitro* el crecimiento de los microorganismos limita el desarrollo de las células. Esto debido a que la asociación explante-medio y las condiciones ambientales en las que se incuban los cultivos proporcionan un ambiente propicio para la proliferación de patógenos (hongos y bacterias). De tal forma que estos pueden destruir el explante, competir por los nutrientes del medio de cultivo o modificarlo con toxinas. Es así que evitar la contaminación por microorganismos resulta un aspecto básico para el establecimiento del cultivo *in vitro* (21). La desinfección se limita generalmente al proceso de destrucción de los microorganismos mediante métodos químicos; la esterilización se refiere a menudo al método físico, para la destrucción de los microorganismos. En el cultivo de tejidos vegetales se emplea la palabra asepsia como sinónimo de estéril, ausente de microorganismos (21). Considerando que los tejidos de las plantas intactas sanas son asépticos internamente y que la principal tarea de limpieza del material para explantes está limitada a la desinfección superficial, es conveniente tomar en cuenta los siguientes aspectos para el establecimiento de cultivos *in vitro* asépticos (21): a) trabajar en ambientes adecuados, b) esterilizar los medios de cultivo, c) desinfectar superficialmente el material vegetativo, liberándolo de bacterias y hongos exógenos, y d) realizar las disecciones y transferencias respetando ciertas normas de asepsia. Para la desinfección del material vegetativo se utiliza una serie de productos químicos, pero comúnmente es generalizado el empleo de etanol al 70% y de hipoclorito de sodio (NaOCl), del 1 al 3%, contenido en productos de uso doméstico. Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio $[Ca(OCl)_2]$, del 6 al 12%, pero que reacciona con el CO_2 de la atmósfera, por lo tanto es químicamente inestable y el cloruro de mercurio ($HgCl_2$) del 0.1 al 1.5%, aunque este compuesto es altamente tóxico y no se remueve fácilmente del explante (21). La efectividad de los agentes desinfectantes puede ser mejorada al adicionarles pequeñas cantidades de detergente, como Tween-20, del 0.01 al 0.1%. El detergente rompe la tensión superficial y permite que el agente penetre y elimine los microorganismos. (21). Después de tratar el explante con las soluciones desinfectantes es necesario remover de él los restos del producto, mediante varios lavados con agua destilada estéril trabajando en la cámara de transferencia. Se aconseja realizar los lavados con un volumen por lo menos 10 a 20 veces mayor de agua destilada estéril, haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos (8). Algunas veces es necesario utilizar antibióticos en el medio de cultivo para la desinfección de los explantes. Sin embargo, el empleo de éstos es en casos de excepción y en cultivos de corta

duración, ya que poseen una alta especificidad, previniendo únicamente la proliferación de determinados microorganismos. Además, estos productos modifican la composición del medio de cultivo y pueden ser metabolizados por los explantes (8). Generalmente las plantas herbáceas son más fácilmente desinfectadas que las plantas leñosas, puesto que estas son de propagación lenta, complicada por los ciclos de letargo y presentan varias formas de madurez y juvenilidad y crecen en el campo por muchos años y están expuestas a microorganismos, interna y externamente, difíciles de erradicar (8). En los procedimientos de desinfección se puede emplear sólo etanol o solamente NaOCl, lo más frecuente es la utilización de ambos, es decir, una inmersión generalmente corta en etanol al 70% seguida de una en NaOCl y de varios lavados con agua destilada estéril. Al llevar a cabo la desinfección superficial de los explantes se deben de eliminar los microorganismos con el menor daño posible a los tejidos. Existen diferentes formas de desinfección, dependiendo de la especie de planta de que se trate o del estado de desarrollo de la misma. Al igual, la selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan en gran medida por las características del explante. En la práctica, se establecen experimentalmente por ensayo y error (9). Los explantes provenientes de vegetales que crecen en invernaderos o en cuartos climatizados son relativamente más fáciles de desinfectar que aquellos provenientes del campo. También es más fácil la desinfección de explantes de órganos jóvenes que la de explantes de materiales adultos. Las aplicaciones de fungicidas o bactericidas aplicadas previamente a las plantas pueden ser de utilidad (9). Para el establecimiento y posterior manipulación de los cultivos es preciso adoptar ciertas normas de asepsia en las tareas que se llevan a cabo en la cámara de flujo laminar. Antes de comenzar a trabajar, desinfectar la mesa y las paredes de la cámara con etanol al 70%. Desinfectar también la parte exterior de los recipientes antes de introducirlos en la cámara. Lavarse las manos hasta el antebrazo antes de comenzar y luego desinfectarlos con etanol al 70%, el uso de mascarillas no es imprescindible, pero reduce la contaminación si se opera en flujos laminares de aire estéril. Los instrumentos metálicos empleados se deben de flamear previamente con etanol al 95%. El material de vidrio utilizado como soporte para las disecciones debe estar esterilizado. Realizar las operaciones de transferencia y disección lo más cerca posible de la llama del mechero, evitando las exposiciones prolongadas de los explantes o de los medios de cultivo en recipientes abiertos (9).

c. Procedimiento general para desinfectar material vegetal

Eliminar las partes que no van a ser útiles (preparación del material vegetal).

Sumergir el material ya preparado en la solución desinfectante y dejarlo en esta por un tiempo más o menos prolongado, dependiendo de la especie vegetal.

Llevar el material a la cámara de flujo laminar y lavar repetidas veces con agua destilada estéril, por lo menos tres lavados de cinco minutos cada uno.

Colocar el material en cajas de petri u otros recipientes estériles (6).

3.1.15. Medios de cultivo

El éxito del cultivo de tejidos de plantas está muy influenciado por la composición química de los medios de cultivo utilizados y otros factores ambientales. Las plantas, para que puedan crecer y desarrollarse, deben de absorber del suelo cantidades importantes de macronutrientes como las sales de nitrógeno, potasio calcio, fósforo, magnesio, azufre y micronutrientes como sales de hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto (14).

El medio de cultivo contiene estos elementos, además de carbohidratos, usualmente la sacarosa, para reemplazar el carbono que la planta fija normalmente de la atmósfera por medio de la fotosíntesis. También contiene compuestos orgánicos en pequeñas cantidades como vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento (14).

Una vez elegido el medio de cultivo, según el objetivo definido, es necesario considerar sus componentes y su preparación, Los medios de cultivo se encuentran constituidos por los siguientes componentes:

B. Macronutrientes (14).

Además de carbono, hidrógeno y oxígeno, los tejidos en cultivo requieren de una fuente constante de compuestos inorgánicos, principalmente los elementos siguientes:

- a. **Nitrógeno.** Se adiciona en grandes cantidades y se encuentra presente en el medio en forma de nitrato o iones amonio, o la combinación de ambos iones. Otras fuentes de nitrógeno incluyen glutamina, urea y caseína hidrolizada.
- b. **Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).** Satisface tanto el requerimiento de magnesio como el de azufre.
- c. **Fósforo.** Puede adicionarse en cualquiera de las formas $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ó KH_2PO_4 . Este es necesario para el metabolismo de las plantas, principalmente para sintetizar el ATP como fuente de energía.
- d. **Potasio.** Puede adicionarse en grandes cantidades en la naturaleza, es un catión que se agrega en forma de KCl , KN_3 ó KH_2PO_4 .
- e. **Calcio.** Se adiciona como $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ o la forma anhidra de cualquier sal.
- f. **Sodio.** Este catión no es requerido por plantas superiores, sin embargo, puede ser un elemento esencial para cultivo de halófilas o plantas C_4
- g. **Cloro.** Está presente en la forma de KCl ó $CaCl_2$.

C. Micronutrientes (14).

Para una adecuada actividad metabólica las plantas requieren de micronutrientes, entre los esenciales están: hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, cobalto y molibdeno. Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos.

- a. **Hierro.** Conjuntamente con un agente quelante (Na_2EDTA) lo hace disponible en un amplio rango de pH. Es requerido para la formación de precursores de la clorofila.
- b. **Manganeso.** Es necesario para el mantenimiento de la ultraestructura y el proceso fotosintético.
- c. **Cobre y Zinc.** Son requeridos para la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos.
- d. **Molibdeno.** El molibdeno, junto al hierro, forman parte de las enzimas nitrato reductasa y nitrogenasa.
- e. **Cobalto.** Es el metal componente de la vitamina B_{12} .
- f. **Boro.** Es necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática. Está involucrado en la síntesis de bases nitrogenadas, en particular uracilo.

C. Vitaminas

Las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en cantidades traza. Entre las principales vitaminas se encuentran:

- a. **Tiamina (vitamina B_1).** Se añade como tiamina-HCl. Esta es la única vitamina vital para el crecimiento de las células vegetales.
- b. **Piridoxina (vitamina B_6).** Se añade como piridoxina-HCl.
- c. **Mio-inositol.** No es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol, tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, participando probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico.
- d. **Ácido fólico.** Disminuye la proliferación de tejido en la oscuridad, mientras que en la luz la aumenta, esto es debido a que en presencia de luz es hidrolizado a ácido p-aminobenzóico.

e. **Riboflavina.** Es inhibidor del crecimiento de raíces.

f. **Vitamina E.** Ayuda a la formación de callos que provienen de embriones y en cultivos en suspensión ayuda a la viabilidad de células.

D. Reguladores de crecimiento

Un regulador del crecimiento es un compuesto orgánico que, en pequeñas cantidades, promueve, inhibe o modifica cualitativamente el crecimiento y desarrollo del tejido. Las clases comúnmente reconocidas de reguladores del crecimiento vegetales son: las auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y otros inhibidores del crecimiento y el etileno. Los efectos de los reguladores del crecimiento no son absolutos y específicos (17). Generalmente las respuestas de las células, tejidos y órganos *in vitro* pueden variar de acuerdo con las condiciones de cultivo, tipo de explante, genotipo de la planta y medio de cultivo.

El crecimiento y la morfogénesis *in vitro* son regulados por la interacción y el balance entre reguladores suplementados en el medio de cultivo y las sustancias del crecimiento (hormonas) producidas en forma endógena (17).

El crecimiento de las plantas está controlado por procesos fisiológicos que a su vez se manejan por la intervención de varios compuestos orgánicos llamados hormonas que se producen en el interior del vegetal (17).

En las últimas décadas se han preparado compuestos orgánicos sintéticos con efectos reguladores en los distintos procesos fisiológicos. A estos compuestos se le ha llamado “reguladores de crecimiento”, los que han sido utilizados en propagación de plantas. En el campo de la propagación *in vitro*, también se utilizan los reguladores de crecimiento, fundamentalmente los denominados promotores del crecimiento (auxinas, citocininas y giberelinas) (17).

En el campo de la propagación *in vitro*, se utilizan ampliamente los reguladores de crecimiento. Los sistemas ambriogénicas requieren para la inducción de sus embriones concentraciones altas de auxinas siendo las más utilizadas 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) o bien AIA (ácido indolacético). Para la organogénesis, en la cual se induce la formación de callo,

se utilizan diferentes relaciones de concentraciones de auxinas-citocininas prefiriendo mayores concentraciones de auxinas (12).

a. Auxinas

La función biológica de las auxinas se orienta a la expansión de las células de tallo y coleóptilos, también cumplen funciones de división celular y fomentan el desarrollo de callos, de los que se desprenden posteriormente crecimiento radiculares. También se ha utilizado para la inhibición de raíces de varias especies vegetales. Una de las teorías de la acción de las auxinas, indica que las auxinas aumentan la plasticidad de las paredes celulares, al aumentar la flexibilidad de las paredes disminuye la presión de esta alrededor de la célula y la presión de turgencia causada por las fuerzas aromáticas en la savia vacuolar hace que el agua entre a las células, provocando su expansión.

Las Auxinas ayudan a la elongación de las células, inducción de callo y formación de raíz y brotes. Las auxinas empleadas frecuentemente son: AIB (ácido indolbutírico), AIA que se utilizan en un rango de 0.1 a 10 mg/l ANA (ácido naftalenacético), el 2,4-D y el PCA (ácido paraclorofenoxiacético que se utilizan en un rango de 0.001 a 4 mg/l. La actividad auxínica en células cultivadas se considera de la siguiente manera: 2,4-D, ANA, AIB, AIA (4).

Selección de auxinas

La selección de auxinas ha utilizar y la concentración requerida dependerán de los factores siguientes (17).

1. El tipo de crecimiento o desarrollo requerido.
2. Los niveles naturales de auxina dentro del explante cuando es disectado.
3. La capacidad de los tejidos cultivados para sintetizar auxina en forma natural.
4. La interacción (si hay) entre las auxinas sintéticas aplicadas y las hormonas endógenas naturales.

La auxina elaborada en forma natural: 3-indol-acético (17).

Los compuestos son llamados auxinas si son capaces de controlar varios procesos como el crecimiento celular y elongación celular.

Las auxinas son capaces de iniciar la división celular y están involucradas en dar origen a meristemas surgiendo de tejido no organizado u órgano definidos.

En un tejido organizado, las auxinas son responsables del mantenimiento de la dominancia apical.

Modo de acción de las auxinas (17).

Promueven el crecimiento induciendo la secreción de iones a través de la pared celular. El enlace de la auxina conduce al rompimiento y acidificación de la pared, incrementando su tamaño.

Otro efecto es sobre el metabolismo del ARN (y por tanto la síntesis de proteínas), posiblemente por inducción de la transcripción de moléculas de ARNm. Los ARNm codifican proteínas que son requeridas para mantener (sostener) el crecimiento.

Las auxinas aplicada son capaces de borrar la fisiología programada genéticamente de tejidos de plantas completas, que fuera previamente determinada en su estado diferenciado.

Respuestas fisiológicas de las auxinas (17).

Afectan la expansión celular, a través del aumento de la plasticidad de la pared celular. Este efecto de estimular la expansión celular se traduce en un estímulo al crecimiento, en escala macroscópica. Otra respuesta fisiológica asociada a las auxinas en la síntesis de ARN es el estímulo de la división celular que ocurre en algunas situaciones después de la aplicación de auxina exógena, contribuyendo al estímulo del crecimiento.

Dominancia apical: una auxina producida en el meristemo apical impone un estado de dominancia en las yemas axilares localizadas abajo del meristemo apical, inhibiendo su

crecimiento. Si el meristemo apical es removido, las yemas axilares son liberadas de la dominancia y comienzan a crecer.

Otros efectos más específicos, como la inducción de la floración.

Efectos de las auxinas en el cultivo de tejidos vegetales (17).

Los principales efectos de las auxinas en el cultivo de tejidos vegetales son los siguientes:

1. Inducción de la formación de callos.
2. Inhibición de formación de clorofila.
3. Morfogénesis: formación de raíz y brote.
4. Embriogénesis somática: altos niveles de auxina 2,4-D.
5. Cultivo de órganos: una auxina es casi invariablemente requerida para promover el crecimiento inicial de explantes de meristemo y puntas de brotes.

Estabilidad de las auxinas en los medios de cultivo

El ácido indol acético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB) son termolábiles y son descompuestos durante la esterilización en autoclave, pero el AIA no es estable en el medio de cultivo aún si es esterilizado por ultrafiltración.

Ruta de la biosíntesis del ácido indolacético (AIA) (17).

El AIA es formado a partir del aminoácido L-triptofano, y los niveles endógenos de las auxinas incrementan rápidamente en tejidos incubados en medio de cultivo conteniendo este aminoácido. L-triptofano puede también actuar como una auxina en algunas plantas, en estos casos puede estimular el crecimiento o inducir morfogénesis (crecimiento de callo de híbridos de

Nicotiana glauca X *N. Langsdorfi*, y la formación de callos embriogénicos en algunos cultivares de arroz.

b. Citocininas

Las funciones fundamentales de las citocininas son: provocar la división celular, y la regulación de la diferenciación de los cultivos. Las auxinas y citocininas interactúan y dan como resultado expresiones diferentes de crecimiento (10).

Las citocininas promueven la división celular, formación de brotes adventicios y axilares, embriogénesis e inhibición de formación de raíz. Las más utilizadas son: BA (benciladenina) llamada también bencilaminopurina (BAP), la cinetina y zeatina, utilizadas en concentraciones de 0.0.3 a 30 mg/l y el 2-iP (2-isopentenilaminopurina) que se utilizan en un rango de 5.0 a 20 mg/l (17).

La citocinina más conocida es la cinetina, que es un regulador del crecimiento. Un ejemplo de citocinina natural es la zeatina que se encuentra en el endospermo de granos inmaduros de maíz (17).

Las citocininas producen una variedad de efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, además de promover división celular e interacción con las auxinas para inducir desarrollo de raíces y de tallo en un cultivo *in vitro* de tejido de tabaco (17).

Las citocininas también influyen en la estimulación de la germinación, el crecimiento de algunos frutos y el retardo de la senescencia de diferentes órganos. También interactúan con las auxinas y giberelinas para regular el crecimiento y diferenciación de plantas (17).

Diversos antecedentes sugieren que las citocininas se sintetizan en la raíz y son transportadas hacia las hojas en la corriente transpiratoria (17).

Biosíntesis de las citocininas (17)

Las citocininas parecen ser sintetizadas por la incorporación de una cadena lateral, generalmente con cinco carbonos en la posición número seis de la base nitrogenada.

La adenina es la base nitrogenada que tiene la estructura idéntica a la adenina que ocurre en los ácidos nucleicos. Los diferentes tipos de citocininas difieren entre sí por la modificación de las cadenas laterales. Las citocininas naturales son encontradas en todas las plantas superiores, en las algas y en los hongos y en ciertas bacterias como moléculas libres.

Mecanismos de acción (17).

Las hormonas, de una manera general, probablemente se integran con receptores que se encuentran en la superficie de la membrana celular o en el citoplasma. Recientemente fue identificada una proteína que actúa como receptor para una citocinina a la cual fue denominada "cytokinin binding factor" (CBF).

Se sugiere que este receptor de la proteína del ribosoma y que este complejo citocinina-receptor regula la síntesis de proteínas.

Existen indicativos de que las citocininas aumentan la concentración de calcio en el citoplasma, promoviendo su absorción del medio externo. La calmodulina es inactiva como regulador, pero el complejo calmodulina-calcio puede activar gran número de enzimas.

Las citocininas parecen estimular la síntesis de proteínas específicas del cloroplasto, estabilizando ciertos mARNs específicos que tienen degradación difícil.

Actividad biológica de las citocininas

Las citocininas, en cultivo de tejidos, junto a las auxinas, estimulan la división celular y el control de la morfogénesis. Agregando a un medio de cultivo de brotes, estos compuestos inhiben la dominancia apical y liberan a las yemas laterales de dormancia (17).

Efectos fisiológicos de las citocininas (17).

Entre los principales efectos fisiológicos de las citocininas se pueden mencionar los siguientes:

1. Inducción de división celular y formación de órganos.
2. Las citocininas parecen reducir la fase G1, período entre la mitosis y el inicio de la síntesis de ADN, y alarga la fase G2, período entre el final de la síntesis de ADN y el inicio de la mitosis.
3. En cultivo de tejidos, las citocininas parecen ser necesarias para la división celular en plantas. En su ausencia la metafase, pero no la profase de la mitosis, es prolongada considerablemente y ha sido sugerido que las citocininas pueden ser requeridas para regular la síntesis de proteínas involucradas en la formación y función del huso mitótico.
4. En relación con las citocininas la más utilizada es la cinetina (KIN) (6-furfuril-aminopurina), pero se ha demostrado que otras cumplen la misma actividad biológica que KIN, como lo son zeatina (ZEA) y bencilaminopurina (BAP), las cuales se consideran más potentes que la primera. BAP (6-bencilaminopurina) es la más utilizada por su disposición en el mercado y bajo costo. ZEA (6(4-hidroxi-3-metil-but-trans-2-serilamino)purina), se considera 10 veces más potente que KIN pero es difícil su obtención en el mercado. BAP tiene su punto óptimo en cuanto a la concentración más utilizada de 0.1 a 2 mg/l, similar a la KIN (17).

c. Ácido giberélico

Promueve la elongación del tallo, disminuye o previene la formación de raíces adventicias, brotes o embriones somáticos (10).

d. Ácido abscísico

Se utiliza en caso muy especiales, estimula la sincronización durante la embriogénesis en ciertos cultivos. También inhibe el crecimiento (10).

e. Aminoácidos

Con la excepción de la glicina (ácido aminoacético), que es un componente de varios medios de cultivo, los aminoácidos no son constituyentes esenciales de los medios de cultivo. Inclusive en concentraciones elevadas pueden causar efectos inhibitorios sobre los cultivos. Si una mezcla de nitrógeno orgánico es necesaria el medio puede ser enriquecido con caseína hidrolizada o ácidos casámicos. También en algunas ocasiones se emplea L-asparagina para estimular raíces, la cisteína como agente reductor y L-serina en el cultivo de microsporas (10).

f. Carbohidratos

La mayoría de cultivos *in vitro*, requieren una fuente de carbono y energía. La sacarosa es el azúcar empleado comúnmente en concentraciones de 2 a 5%. Se puede reemplazar por glucosa, fructosa y, con menor efectividad, la maltosa y galactosa (23).

g. Agua

El agua que se utiliza en los medios de cultivo debe ser desmineralizada y/o destilada (23).

h. Agentes solidificantes

Como agente gelificante para los medios de cultivo sólidos y semisólidos se utiliza comúnmente el agar (0.6 a 1.0%). El grado de pureza es de suma importancia, ya que de lo contrario puede inhibir el crecimiento de las vitroplantas. Dentro de las ventajas que posee está que al mezclarse con agua forma geles estables a todas las temperaturas de incubación, ya que se derriten a 100°C y se solidifican a 45°C. El agar no es alterado por las enzimas vegetales. Tampoco interfiere con la movilización, ni reacciona con los constituyentes del medio (23).

i. Otros Componentes

Existen, además, algunos suplementos utilizados en los medios de cultivo, tales como: extracto de levadura, jugos y extractos de varios frutos como plátano, tomate, papa y agua de coco. Se adicionan ácidos orgánicos como el cítrico, málico, el succínico y el pirúvico como

precursores de aminoácidos. Los antioxidantes (ácido ascórbico, L-cisteína, polivinilpirrolidona) se emplean para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimiento y eventual muerte de los explantes. Para disminuir los efectos de la oxidación estas soluciones antioxidantes pueden agregarse durante la preparación del explante, incubar los cultivos en la oscuridad o a bajas intensidades de luz o acortar el intervalo de tiempo entre subcultivos. El carbón activado (0.1 a 5%), incorporado al medio, actúa como absorbente de metabolitos tóxicos (22).

El medio de cultivo se selecciona de acuerdo a los requerimientos nutricionales de las plantas. Los factores más importantes a considerar son el origen del explante, los compuestos nutritivos esenciales y los reguladores del crecimiento empleados. Para la preparación del medio de cultivo generalmente se mezclan varias sustancias en una solución madre o concentrada elaborada por el investigador, siendo importante la calidad de los reactivos químicos y el agua a utilizar bidestilada o desmineralizada-destilada. En la elaboración de las soluciones madre hay que considerar la incompatibilidad de ciertas sustancias, por lo que se deben de preparar individualmente. El calcio no puede mezclarse con fosfato o sulfato, ni el magnesio con fosfato (22).

Las soluciones de sales inorgánicas pueden ser almacenadas por tiempo indefinido a la temperatura ambiente. Sin embargo, la que contiene hierro debe ser protegida de la luz. Las soluciones de algunas sustancias orgánicas, como las citocininas, generalmente se refrigeran. Las auxinas deben de estar refrigeradas. Las soluciones deben de ser utilizadas antes de dos semanas (18).

La concentración del ión H^+ (pH) produce un efecto en la absorción iónica en los medios de cultivo. La acidez y la alcalinidad extrema inhiben el crecimiento de las vitroplantas. El pH apropiado es entre 5.4 y 6.0 y se ajusta con HCl y KOH o NaOH según la especie de la planta a cultivar. El agente solidificante se adiciona una vez que el pH se ha ajustado. Para disolverlo se lleva el medio a ebullición y luego se esteriliza en el autoclave, a $121^{\circ}C$, durante 15 a 20 minutos, a una presión de 1.05 kg/cm^2 . Se debe de evitar el almacenamiento prolongado del medio de cultivo para evitar la contaminación (18).

3.1.16. Condiciones ambientales para la incubación

Las condiciones del ambiente influyen en varios aspectos sobre el desarrollo de las vitroplantas. En tejidos vegetales el explante se incuba en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a la luz y a la temperatura. Las respuestas morfogénéticas pueden ser alteradas por la temperatura, así como por la calidad, intensidad y duración de la luz (18).

La temperatura de incubación varía según el clima. Para plantas de clima templado entre 20 y 30°C. Plantas tropicales entre 25 y 30°C y plantas glaciales entre 15 y 20°C. Con iluminación suficiente las plantas crecen fuertes, con poca altura pero con hojas bien desarrolladas, mientras que con poca iluminación crecen débiles con hojas pequeñas y anormales. Sin embargo, no se recomienda una iluminación excesiva puesto que emite mucho calor, lo que es negativo para el crecimiento de las plantas (18).

Normalmente lo mejor es una iluminación entre 1000 a 3000 lux, según la especie de la planta, para lo cual se utilizan lámparas fluorescentes (tipo luz de día) y lámparas incandescentes. Las plantas requieren un fotoperíodo constante según sus necesidades fisiológicas, por lo tanto se debe de mantener un tiempo apropiado para cada especie de planta. Comúnmente se utiliza un ciclo de fotoperíodo 16 horas luz por ocho horas de oscuridad, existiendo algunas variantes como 12 horas x 12 horas ó 18 horas x 6 horas. Una humedad relativa entre 70 a 80 % es adecuada (18).

3.1.17. Regeneración de plantas en cultivo de tejidos

La regeneración de plantas que se cultivan *in vitro* se puede lograr mediante dos caminos: directamente de los explantes y a partir de callos. Se puede generar plantas a través de la organogénesis que incluye el desarrollo de yemas a maristemos radicales a partir de explantes directamente o bien a partir de callo; también se puede generar planta a partir de embriogénesis somática, o sea la producción de embriones a partir de células que no derivan de fusión de gametos (12).

3.1.18. Oscurecimiento oxidativo

La coloración café del explante en el medio de cultivo es causado por oxidación de compuestos fenólicos provocado por una herida al tejido. Estos compuestos son exudados dentro del medio, son atrapados por el agar y acumulados, formando un área negra alrededor del explante. Esta puede interferir con la absorción de nutrientes, resultando una inhibición del crecimiento (3).

Al herir o romper los tejidos se estimula mucho la respiración por tres razones:

1. La primera es la rápida oxidación de los compuestos fenólicos que tienen lugar cuando las reorganizaciones celulares mantienen a los substratos separados de sus oxidasas (3).
2. La segunda, los procesos normales de glicólisis y catabolismo oxidativo que aumentan conforme la destrucción de la célula o células causa una mayor accesibilidad de los substratos a la maquinaria enzimática de la respiración (3).
3. Tercero la secuencia general de la herida es la reversión de ciertas células al estado meristemático seguido por la formación de callo y la "curación" o reparación de la herida. Tales células y tejidos en activo crecimiento tienen tasas respiratorias muy superiores a los tejidos maduros o en descanso (3).

3.2. Marco referencial

3.2.1. Cultivo de tejidos del arándano

La propagación de los arándanos se lleva a cabo en gran parte por brotes, aunque la regeneración directa es posible. Los explantes que provienen de plantas adultas son más difíciles de establecer que de material joven, muchos no sobreviven y el índice de crecimiento inicial es bajo. Algunos de los explantes restantes producen brotes largos y gruesos, pero otros pueden dar brotes pequeños y filamentosos y entrenudos cortos. Los brotes de la última clase son similares a los producidos en semillero y tienen la misma capacidad para la supervivencia y proliferación (20).

Donde es necesario utilizar explantes de plantas adultas, se recomienda que la selección sea de buena calidad y estos se coloquen en un medio con una concentración baja de iones, tal como las sales de MS, mas vitaminas, y crecen lentamente hasta que se establecen. Es también recomendable colocar gran cantidad de brotes en medio líquido, y esto debido a que sólo en pequeñas proporciones es probable que sobrevivan y den yemas axilares rejuvenecidas (20).

Para iniciar un cultivo, la utilización de las puntas de brotes o yemas axilares se transfieren a un medio semi-sólido, las secciones desinfectadas de los brotes, de varios centímetros de largo, sean sembrados en una tubo semisellado con medio semilíquido. Algunos de estos explantes producen brotes axilares con varios entrenudos después de ocho semanas de incubación, luego se hacen cortes del explante, cada dos nudos y se colocan horizontalmente en la superficie fresca de un medio semi-sólido (20).

4. OBJETIVOS

4.1. General

Contribuir al desarrollo de una metodología para la micropropagación del arándano

4.2. Específicos

4.2.1. Experimento I. Micropropagación utilizando hojas como explantes

1. Determinar la dosis de 2iP que produce la mayor altura de planta, en cada una de las variedades en estudio.
2. Determinar la dosis de 2iP que produce el mayor número de hojas, en cada una de las variedades en estudio.
3. Determinar la dosis de 2iP que produce el mayor número de entrenudos, en cada una de las variedades en estudio.
4. Determinar la dosis de 2iP, que produce el mayor número de plantas regeneradas, en cada una de las variedades en estudio.
5. Determinar la dosis de 2iP, que produce, potencialmente, la mayor tasa de propagación, en cada una de las variedades en estudio.

4.2.2. Experimento II. Micropropagación utilizando microesquejes como explantes

1. Determinar la altura de planta que produce cada variedad.
2. Determinar el número de hojas que produce cada variedad.
3. Determinar el número de entrenudos que produce cada variedad.

4. Determinar el número de plantas regeneradas que produce cada variedad.
5. Determinar la tasa de propagación que produce cada variedad.

5. HIPOTESIS

5.1. Experimento I. Micropropagación utilizando hojas como explantes

1. Al menos una dosis de 2iP produce una mayor altura de planta, en cada una de las variedades en estudio.
2. Al menos una dosis de 2iP produce un mayor número de hojas, en cada una de las variedades en estudio.
3. Al menos una dosis de 2iP produce un mayor número de entrenudos, en cada una de las variedades en estudio.
4. Al menos una dosis de 2iP produce un mayor número de plantas regeneradas, en cada una de las variedades en estudio.
5. Al menos una dosis de 2iP produce, potencialmente, una mayor tasa de propagación, en cada una de las variedades en estudio.

5.2. Experimento II. Micropropagación utilizando microesquejes como explantes

1. Cada variedad produce una altura de planta diferente a las otras.
2. Cada variedad produce un número de hojas diferente a las otras.
3. Cada variedad produce un número de entrenudos diferente a las otras.
4. Cada variedad produce un número de plantas regeneradas diferente a las otras.
5. Cada variedad tiene una tasa de propagación diferente a las otras.

6. METODOLOGÍA

6.1. Área experimental

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), Bárcena, municipio de Villa Nueva, departamento de Guatemala.

6.2. Material experimental

En esta investigación se utilizaron las variedades de arándano tipo “ojo de conejo” Woodard, Climax y Tifblue, pertenecientes a la especie *Vaccinium ashei* Readel. Las plantas madre fueron establecidas *in vitro* en el laboratorio de Biotecnología del ICTA en Bárcena, Villa Nueva, Guatemala.

6.3. Selección de las dosis de 2iP (2 isopentenilaminopurina)

Se seleccionaron las dosis de 3, 4, 5, 6 y 7 mg/l debido a que existen referencias de trabajos previos realizados sobre el arándano tipo “ojo de conejo” (*Vaccinium ashei* Readel), tales como los de Zimmerman y Roone (1980) (24),. que utilizó dosis de 5, 10, 15 y 20 mg/l, utilizando hojas como explante en la variedad “berkeley” y Robles (2003) (15) que realizó una investigación de micropropagación del arándano utilizando brotes axilares como explantes y utilizó dosis de 2iP de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/l.

6.4. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el WPM (Woody Plant Media), desarrollado por Lloyd y M^cCown (1981) (13). A continuación el siguiente flujograma indica los pasos que se siguieron para su preparación (figura 1).

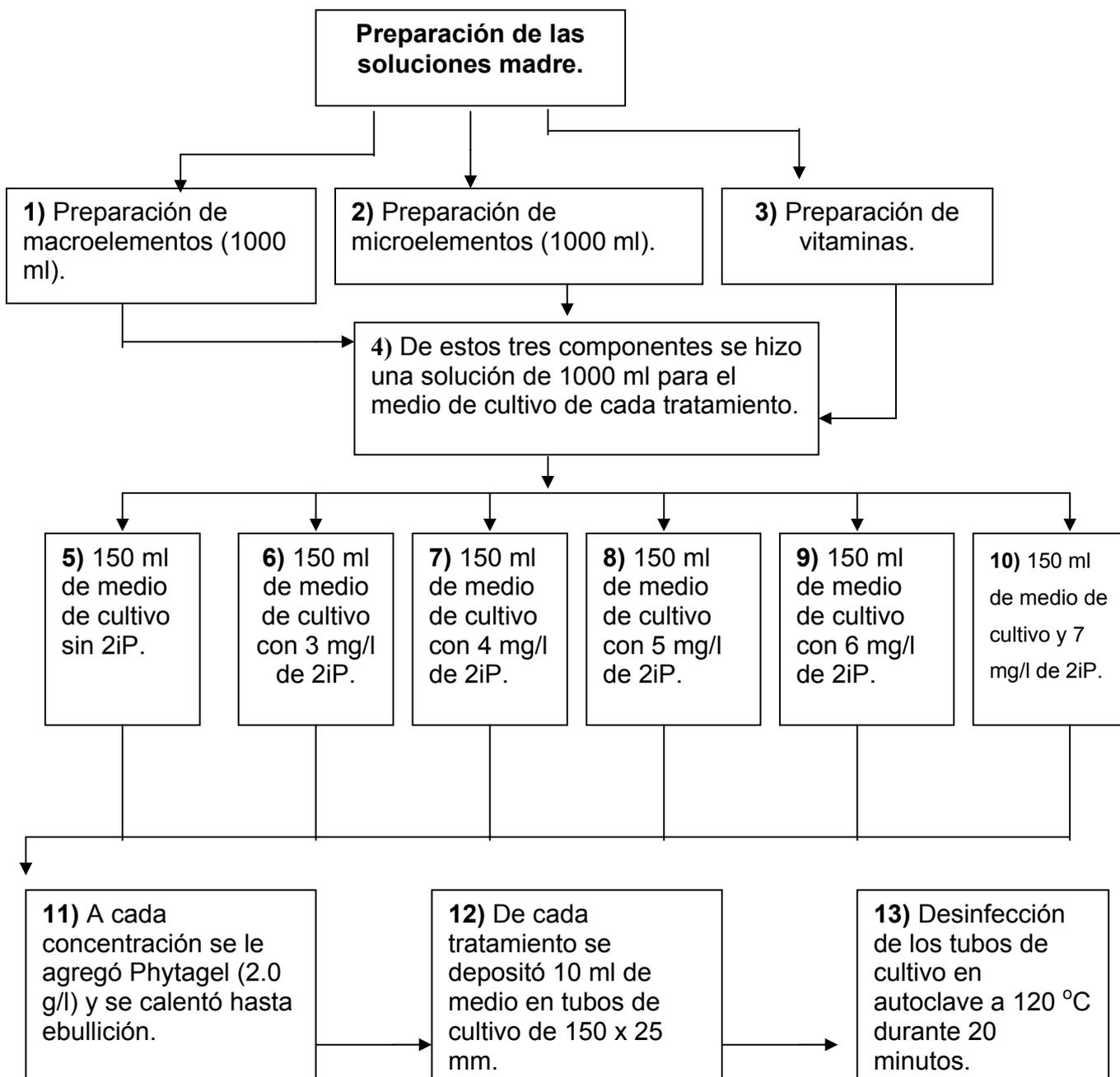


Figura 1. Flujograma de la preparación de las soluciones madre y los medios de cultivo.

6.5. Micropropagación

La metodología utilizada en la micropropagación de las tres variedades de arándano consistió en dos experimentos simultáneos, cuyas principales características se ilustran en la figura 2.

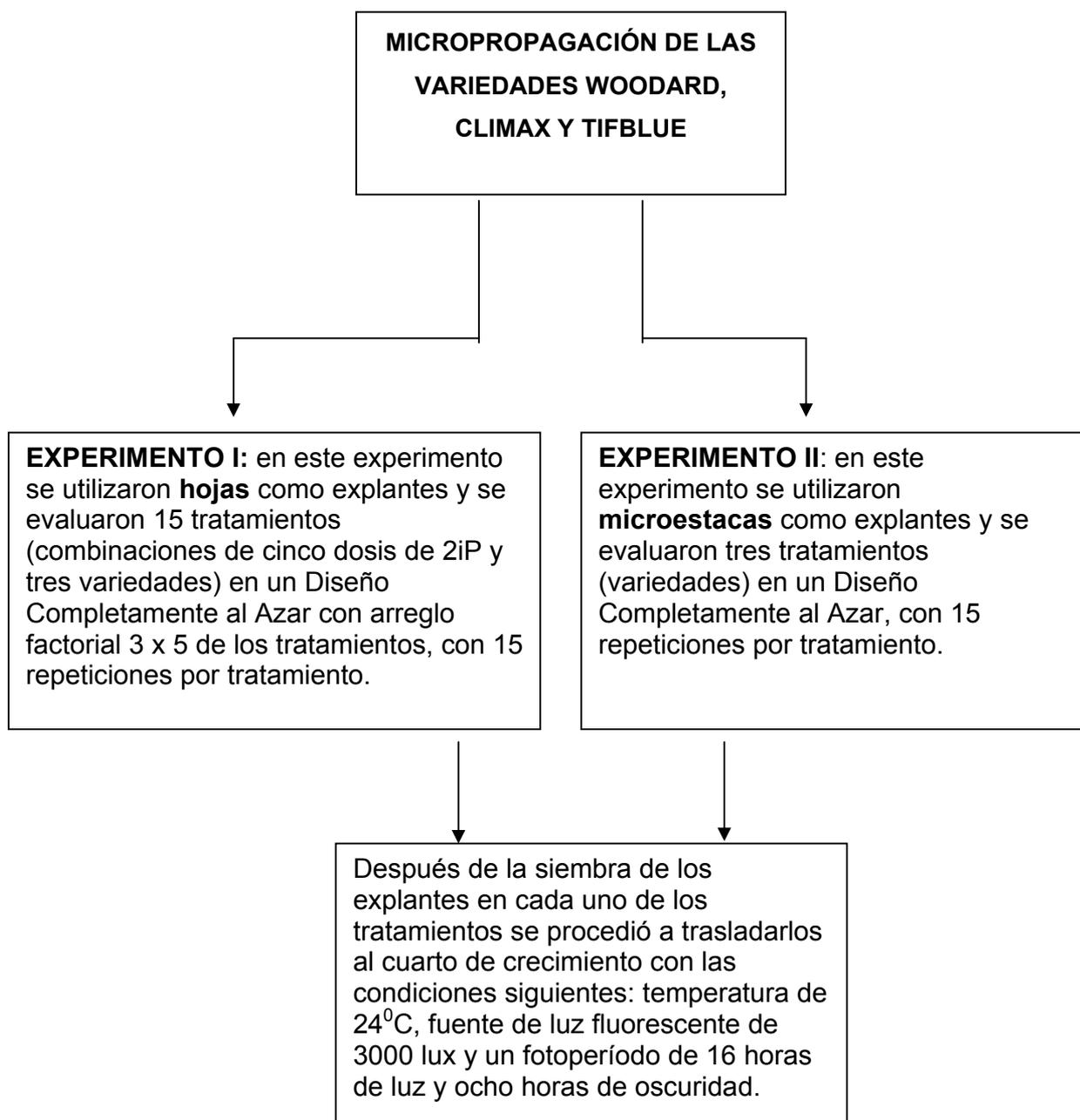


Figura 2. Flujograma de los experimentos empleados para la micropropagación del arándano.

6.6. Experimento I

6.6.1. Micropropagación utilizando hojas como explante

A. Tratamientos

Los tratamientos evaluados en este experimento fueron 15, que consistieron en la combinación de niveles de dos factores: el factor "A" lo constituyeron las variedades (Woodard, Climax y Tiblue) y el factor "B" lo constituyeron las dosis de 2iP (3, 4, 5, 6 y 7 mg/l). El cuadro 3 da detalles sobre el arreglo factorial combinatorio de los tratamientos.

Cuadro 3. Arreglo combinatorio de los tratamientos utilizando hojas como explantes.

No. de Tratamiento	Factor "A" Variedad	Factor "B" Dosis de 2iP (mg/l)	Código
1	WOODARD	3.0	A1B1
2		4.0	A1B2
3		5.0	A1B3
4		6.0	A1B4
5		7.0	A1B5
6	CLIMAX	3.0	A2B1
7		4.0	A2B2
8		5.0	A2B3
9		6.0	A2B4
10		7.0	A2B5
11	TIFBLUE	3.0	A3B1
12		4.0	A3B2
13		5.0	A3B3
14		6.0	A3B4
15		7.0	A3B5

B. Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó para el montaje y análisis del experimento fue el Diseño Completamente al Azar, con arreglo factorial 3 x 5 de los tratamientos. Cada tratamiento se repitió 15 veces.

C. Modelo estadístico

El modelo estadístico que se utilizó fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \xi_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta obtenida en la ijk -ésima unidad experimental.

μ = Efecto de la media general del experimento.

A_i = Efecto de la i -ésima dosis de 2iP.

B_j = Efecto de la j -ésima variedad.

AB_{ij} = Interacción de la i -ésima dosis de 2iP y la j -ésima variedad.

ξ_{ijk} = Error experimental asociado a la ijk -ésima unidad experimental.

D. Análisis de la información

Previamente ha hacer los análisis de varianza (ANDEVA), para cada variable de respuesta, se hicieron pruebas de normalidad, por medio de la prueba de Shapiro-Wilk, para determinar si los datos tenían normalidad. Posteriormente se procedió ha hacer el ANDEVA por medio del paquete estadístico SAS (Statistical Analysing System) utilizando para ello el procedimiento GLM (General

Linear Model). En los casos en que se encontró significancia para efectos simples se aplicó la prueba de separación de medias de Tukey al 5% de nivel de significancia. Cuando se encontró interacción se analizó por medio de gráficas y para la separación de medias se utilizó el método de mínimos cuadrados (procedimiento Least Square Means de SAS) y se calculó la probabilidad de que cada par de medias fueran o no diferentes.

6.7. Experimento "II"

6.7.1. Micropropagación utilizando microesquejes como explantes

A. Tratamientos

En este experimento se evaluaron tres tratamientos, que consistieron en tres variedades.

B. Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó para el montaje y análisis del experimento fue el Diseño Completamente al Azar. Cada tratamiento se repitió 15 veces.

C. Modelo estadístico

El modelo estadístico que se utilizó fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + \xi_{ij}$$

Donde:

- Y_{ij} = Variable de respuesta obtenida en la ij-ésima unidad experimental.
- μ = Efecto de la media general del experimento.
- A_i = Efecto de la i-ésima variedad.
- ξ_{ij} = Error experimental asociado a la ij-ésima unidad experimental.

D. Análisis de la información

Previamente ha hacer los análisis de varianza (ANDEVA), para cada variable de respuesta, se hicieron pruebas de normalidad, por medio de la prueba de Shapiro-Wilk, para determinar si los datos tenían normalidad. Posteriormente se procedió ha hacer el ANDEVA por medio del paquete estadístico SAS (Statistical Analysing System) utilizando para ello el procedimiento GLM (General Linear Model). En los casos en que se encontró significancia se aplicó la prueba de separación de medias de Tukey al 5% de nivel de significancia.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan y discuten los resultados por experimento y por variable de respuesta.

7.1. Experimento I

7.1.1. Altura de planta

Los resultados del experimento I, a los cuatro meses de cultivo, utilizando hojas como explantes, obtenidos en el laboratorio, para la variable de respuesta altura de planta, de las tres variedades de arándano, se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Altura de planta (cm) de tres variedades de arándano según dosis de 2iP.

Woodard					Climax					Tifblue				
Dosis de 2iP (mg/l)					Dosis de 2iP (mg/l)					Dosis de 2iP (mg/l)				
3	4	5	6	7	3	4	5	6	7	3	4	5	6	7
3.0	0	2.0	4.5	3.0	5.0	4.0	4.0	2.5	3.5	1.5	1.5	0	1.0	1.0
1.5	1.5	3.0	3.0	2.5	3.0	2.5	4.5	2.5	4.0	1.0	1.0	0	1.0	1.5
2.0	1.0	3.0	0	0	4.0	2.0	0	2.5	3.5	1.0	0	1.0	1.5	2.5
2.0	1.5	4.0	2.0	0	0	2.5	0	0	3.5	0	0	1.5	0	2.0
2.0	1.5	3.0	2.0	2.0	0	2.5	2.0	3.0	3.5	0	1.5	2.0	0	1.5
2.5	0	3.5	2.5	2.0	2.5	3.0	2.5	2.0	2.5	1.5	1.0	1.0	1	1.0
3.0	1.0	3.5	0	2.5	2.5	0	3.0	2.5	2.0	1.0	0	1.0	2.0	0
3.0	1.0	4.0	0	2.0	1.5	3.0	2.0	2.5	2.0	1.0	0	0	1.0	0
2.5	1.5	4.0	2.0	0	2.5	0	0	2.0	2.0	1.5	1.0	0	1.0	1.0
1.5	1.5	2.0	2.0	3.0	2.5	2.5	0	3.0	2.5	1.5	1.0	0	1.5	0
1.5	2.0	2.0	2.0	3.0	0	2.5	2.0	2.0	3.0	2.0	1.5	1.0	0	0
1.5	0	0	1.5	2.0	2.0	1.5	2.0	2.0	3.0	1.0	0	1.5	0	1.5
1.5	0	0	2.0	2.5	2.5	0	0	3.0	3.5	1.5	2.0	2.0	1.0	1.5
1.5	1.5	2.0	1.5	1.5	3.0	0	3.0	1.0	0	1.0	0	2.0	1.0	1.5
1.5	2.0	3.0	0	1.5	2.5	2.0	3.0	2.0	3.5	0	1.5	1.5	2.0	1.0

A. Análisis de varianza

El análisis de varianza para la variable de respuesta altura de planta detectó diferencias altamente significativas para las fuentes de variación variedades y dosis de 2iP (cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza para la variable altura de planta.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	F calculada	Pr > Fc
Variedades	2	83.3389	25.91	0.0001 **
Dosis de 2iP	5	478.5306	59.51	0.0001 **
Interacción Variedades por Dosis de 2iP	10	18.2389	1.13	0.3370 NS
Error	252	405.2667		
Total Corregido	269	985.3750		

Pr > Fc = probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

R cuadrado = 0.5887

Coefficiente de variación = 56.36 %

Altura media = 2.25 centímetros

B. Prueba de Tukey para la separación de medias entre variedades

Para determinar las diferencias entre variedades se procedió a hacer una separación de medias por medio de la prueba de Tukey al 5% de nivel de significancia (cuadro 6) la que nos indica que las variedades Climax y Woodard produjeron mayor altura de planta (2.8 y 2.4 cm, respectivamente) que la variedad Tifblue (1.5 cm).

Cuadro 6. Prueba de Tukey para la separación de medias entre variedades.

Variedad	Altura de Planta Promedio (centímetros)	Prueba Tukey al 5%
Climax	2.8	A
Woodard	2.4	A
Tifblue	1.5	B

C. Prueba de Tukey para la separación de medias entre dosis de 2iP

La separación de medias, mediante la prueba de Tukey al 5% de nivel de significancia indica que la dosis de 7 mg/l de 2iP fue la que produjo una mayor altura de planta (1.9 centímetros), al aplicar dosis de 2iP entre 3 y 6 mg/l se reduce la altura de planta (cuadro 7).

Cuadro 7. Prueba de Tukey para la separación de medias entre dosis de 2iP.

Dosis de 2iP (mg/l)	Altura de Planta Promedio (centímetros)	Prueba Tukey al 5%
7	1.9	A
5	1.8	B
3	1.8	B
6	1.6	B
4	1.2	B

Los resultados obtenidos fueron inferiores a los obtenidos por Zimmerman y Roome (1980) (24), quienes reportan que las dosis de 5 y 15 mg/l de 2iP, producen una altura entre 3 y 6 centímetros, utilizando hojas como explante, en el cultivo de arándano, en la variedad "Berkeley", después de cuatro meses de sembrar el explante. Robles (2003) (15), reporta que al utilizar brotes como explantes, combinado con 10 mg/l de 2iP, produce 2.2 centímetros de altura de planta en la variedad Woodard, mientras que en la variedad Climax produjo un resultado de 0.9 centímetros utilizando 5 mg/l y en la variedad Tifblue obtuvo una altura de 0.9 centímetros utilizando 15 mg/l de 2iP.

E. Análisis de regresión lineal simple para dosis de 2iP

Se hizo un análisis de regresión lineal simple entre las dosis de 4 y 7 mg/l de 2iP y la variable de respuesta altura de planta. El ANDEVA de la regresión se muestra que existe regresión lineal simple (cuadro 8). Los parámetros estimados de la regresión (cuadro 9) permitieron generar la ecuación que ajusta a la regresión, y que es la siguiente:

$$Y = 0.6766666667 + 0.1744444444 X$$

Donde:

Y = altura de planta

X = dosis de 2iP (entre 4 y 7 mg/l)

Cuadro 8. ANDEVA para la regresión entre dosis de 2iP y altura de planta.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	F calculada	Pr > F calculada
Regresión Lineal	1	6.8469	4.92	0.0278 *
Error	178	247.5683		
Total Corregido	179	254.4153		

* = significativo al 5%
R-cuadrado = 0.026912

Coefficiente de variación = 72.08 %
Altura media de planta = 1.6 cm

Cuadro 9. Parámetros estimados para la regresión entre dosis de 2iP y altura de planta.

Parámetro	Estimado	T para Ho: Parámetro=0	Pr > T	Error Stándar del Estimado
Intercepto	0.6766666667	6.8469	0.1269 NS	0.44126711
Regresión Lineal	0.1744444444	247.5683	0.0278 *	0.07862240

Pr > |T| = probabilidad de encontrar un valor mayor que el valor absoluto de la T

Claramente se observa la regresión simple entre las dosis de 4 y 7 mg/l de 2iP de la variable de respuesta altura de planta (figura 3)

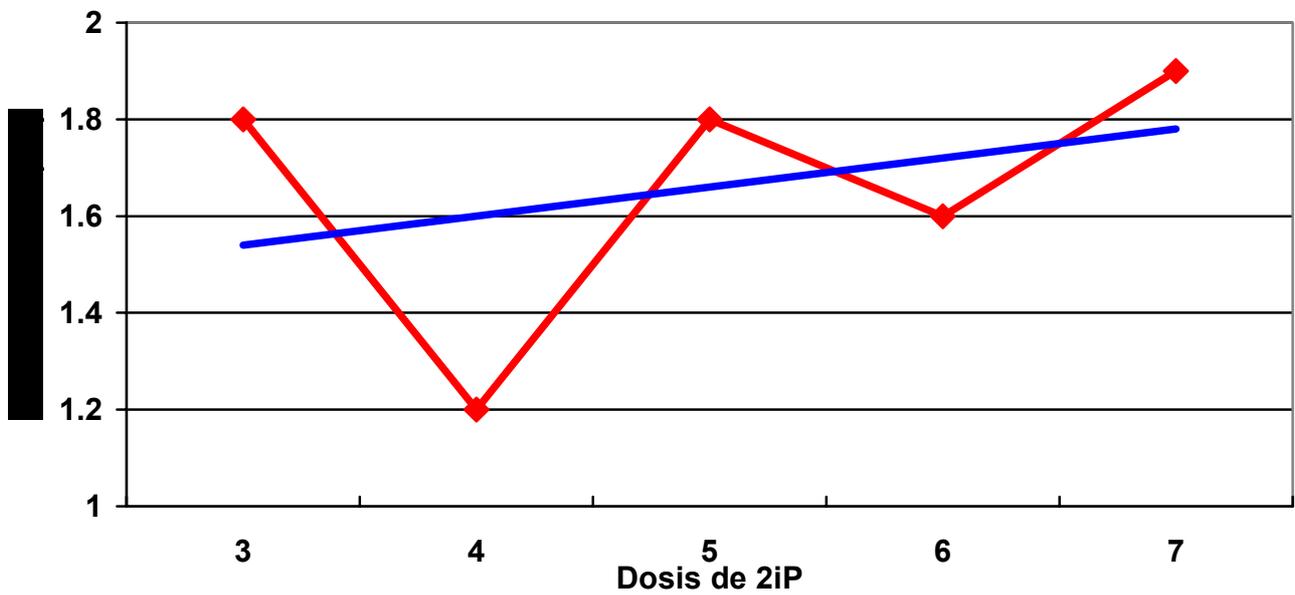


Figura 3. Valores observados (rombos) y regresión lineal simple entre dosis de 2iP y altura de planta.

7.1.2. Número de hojas

Los resultados de laboratorio, para la variable de respuesta número de hojas, obtenidos durante el proceso de la micropropagación de la tres variedades de arándano se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 10. Número de hojas de tres variedades de arándano según dosis de 2iP.

Woodard					Climax					Tifblue				
Dosis de 2iP (mg/l)					Dosis de 2iP (mg/l)					Dosis de 2iP (mg/l)				
3	4	5	6	7	3	4	5	6	7	3	4	5	6	7
10	0	6	7	5	11	12	11	7	9	3	5	0	3	3
5	4	6	4	4	12	4	10	5	8	4	4	0	3	4
5	5	6	0	0	7	5	0	6	10	3	0	4	4	4
6	5	5	4	0	0	6	0	0	10	0	0	4	0	5
7	6	5	4	5	0	7	7	8	11	0	4	3	0	5
7	0	4	3	4	5	6	6	4	12	4	3	3	3	3
11	4	5	0	4	4	0	6	4	6	3	0	3	5	0
11	4	5	0	3	4	5	7	3	7	4	0	0	5	0
7	4	4	3	0	3	0	0	8	6	3	4	0	3	3
5	6	6	3	4	6	4	0	7	5	4	3	0	4	0
6	6	4	4	5	0	3	3	7	7	5	4	4	0	0
6	0	0	2	3	3	6	3	5	5	3	0	3	0	4
7	0	0	3	3	6	0	0	6	6	5	3	5	3	4
5	4	4	4	2	4	0	4	3	0	4	0	5	3	5
6	3	3	0	3	5	4	5	6	5	0	4	3	5	3

A. Análisis de varianza

El análisis de varianza para la variable de respuesta número de hojas y detectó diferencias altamente significativas para las fuentes de variación siguientes: variedades, dosis de 2iP y la interacción variedad por dosis de 2iP. La interacción nos indica que, para cada variedad, el número de hojas depende de la dosis que se use de 2iP (cuadro 11).

Cuadro 11. Análisis de varianza para la variable número de hojas.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	F calculada	Pr > Fc
Variedad	2	408.0074	27.65	0.0001 **
Dosis de 2iP	5	1340.5185	36.34	0.0001 **
Interacción Variedad por Dosis de 2iP	10	289.2370	3.92	0.0001 **
Error	252	1859.3333		
Total corregido	269	3897.0963		

Pr > Fc = probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

R cuadrado = 0.5230

Coefficiente de variación = 55.48 %

Número de hojas promedio = 4.9

B. Interacción variedad por dosis de 2iP

El análisis de la interacción variedad por dosis de 2iP se hizo en forma gráfica (figura 4), donde se puede observar que la dosis de 7 mg/l de 2iP fue la que produjo la mayor cantidad de hojas, en la variedad Climax, sin embargo, la variedad Woodard con la dosis de 3 mg/l de 2iP también produjo una alta cantidad de hojas, pero tiende a disminuir cuando se agregan 4 mg/l de 2iP, a excepción cuando se agrega 5 mg/l de 2iP, aumenta el número de hojas, mientras que en la variedad Tifblue con 3 mg/l de 2iP, para las tres variedades, tienden a incrementar su número de hojas conforme se incrementó la dosis de 2iP, con excepción de la dosis de 3 mg/l, que produjo un número elevado de hojas, en ambas variedades.

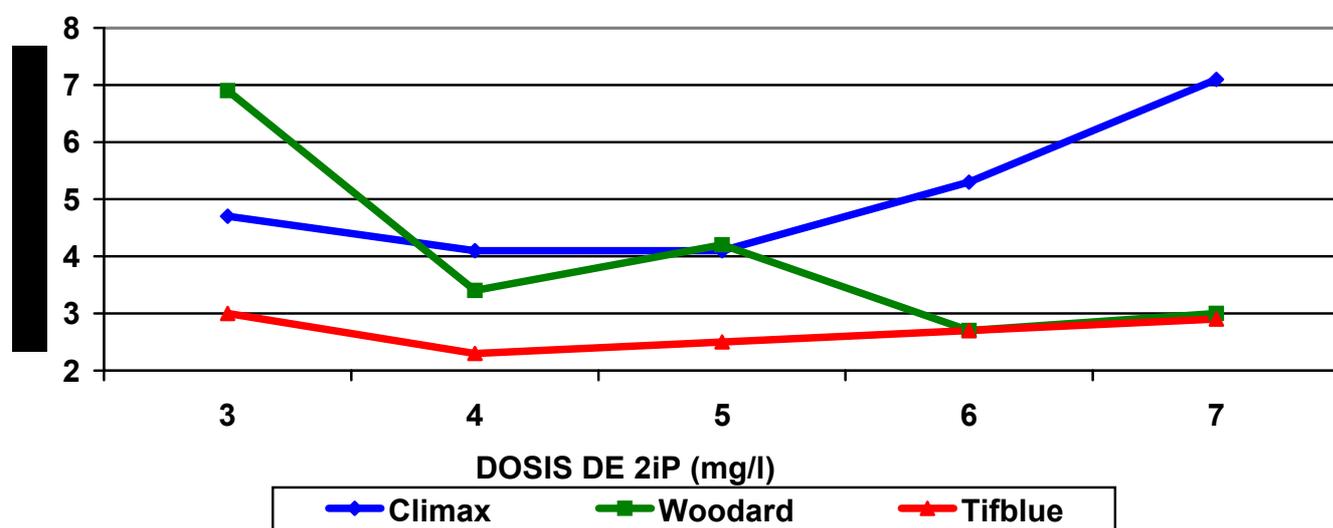


Figura 4. Interacción variedad por dosis de 2iP, para la variable número de hojas.

7.1.3. Número de entrenudos

Los resultados del número de promedio de entrenudos obtenidos en el laboratorio durante el proceso de la micropropagación de las tres variedades de arándano, según dosis de 2iP, se muestran en el cuadro 12.

Cuadro 12. Resultados de laboratorio del número promedio de entrenudos de las tres variedades de arándano según dosis de 2iP.

Woodard					Climax					Tifblue				
Dosis de 2iP (mg/l)					Dosis de 2iP (mg/l)					Dosis de 2iP (mg/l)				
3	4	5	6	7	3	4	5	6	7	3	4	5	6	7
6	0	4	3	4	4	3	3	3	3	2	2	0	1	1
2	3	3	4	3	3	3	4	2	3	1	1	0	1	1
3	3	3	0	0	3	2	0	3	3	1	0	1	1	2
4	3	4	3	0	0	2	0	0	3	0	0	2	0	2
3	2	4	3	4	0	2	2	3	3	0	2	2	0	1
3	0	3	4	2	2	3	3	2	2	1	1	1	1	1
3	3	3	2	2	2	0	3	2	2	1	0	1	2	0
3	2	4	4	2	1	3	2	2	2	1	0	0	1	0
2	2	4	3	0	3	0	0	1	2	1	1	0	1	1
4	2	2	3	3	2	2	0	3	2	1	1	0	1.5	0
2	3	2	2	3	0	2	1	1	3	2	1	1	0	0
2	0	0	0	2	3	1	1	1	3	1	0	1	0	2
2	0	0	0	2	3	0	0	3	3	1	2	2	1	2
3	3	2	3	2	2	0	3	1	0	2	0	2	1	2
2	4	2	4	2	2	2	2	2	3	0	2	2	2	1

A. Análisis de Varianza

El análisis de varianza para la variable de respuesta número de entrenudos detectó diferencias altamente significativas para las fuentes de variación siguientes: variedades, dosis de 2iP y la interacción variedades por dosis de 2iP. La interacción nos indica que, para cada variedad, el número de entrenudos depende de la dosis que se use de 2iP (cuadro 13).

Cuadro 13. Análisis de varianza para la variable número de entrenudos.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	F calculada	Pr > F
Variedad	2	164.7241	35.01	0.0001 **
Dosis de 2iP	5	1089.0046	92.59	0.0001 **
Interacción Variedad por Dosis de 2iP	10	145.3981	6.18	0.0001 **
Error	252	592.7667		
Total Corregido	269	1991.8935		

Pr > Fc = probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

R cuadrado = 0.7024

Coefficiente de variación = 57.31 %

Número de entrenudos promedio = 2.7

B. Interacción variedad por dosis de 2iP

El análisis de la interacción variedad por dosis de 2iP se hizo en forma gráfica (figura 5), donde se puede observar que en las tres variedades la tendencia es a disminuir el número de entrenudos cuando se utilizan dosis entre 3 y 4 mg/l de 2iP. La variedad Climax tiende a aumentar el número de entrenudos si se agrega al medio de cultivo la dosis 5 a 7 mg/l de 2iP. En la variedad Tifblue no existe una dosis adecuada que produzca un número considerable de entrenudos. Con la variedad Woodard parece existir una tendencia de que al aumentar la dosis de 2iP disminuye el número de entrenudos.

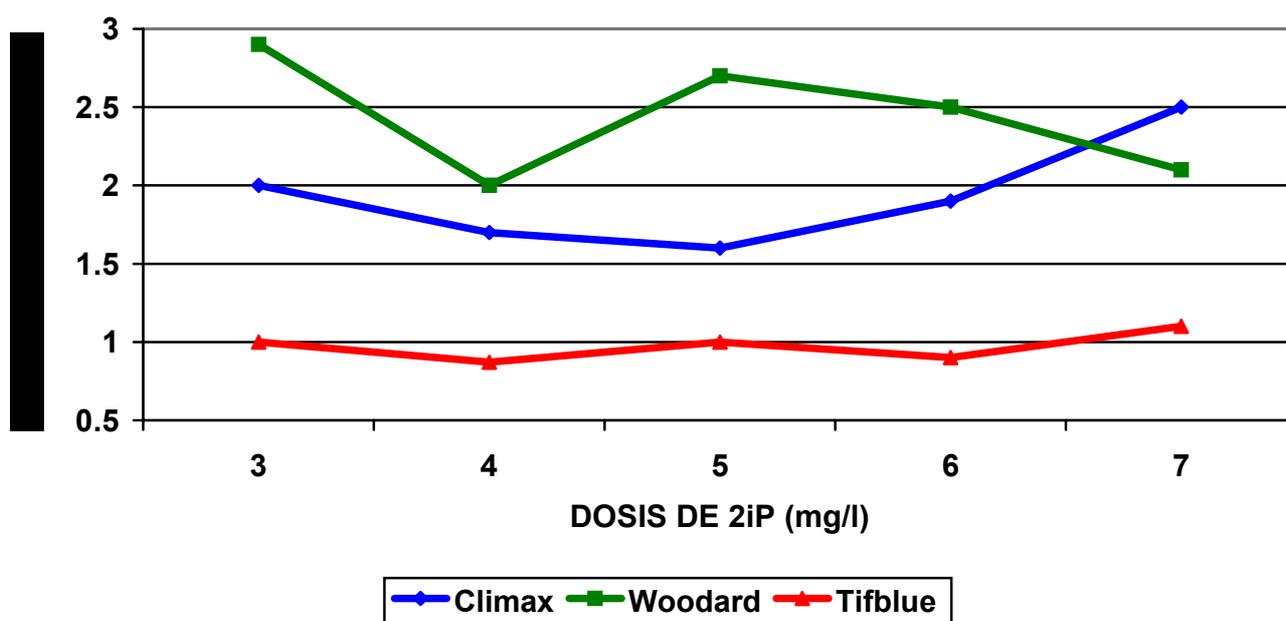


Figura 5. Interacción variedad por dosis de 2iP, para la variable número de entrenudos.

7.1.4. Número de plantas regeneradas

Los resultados de laboratorio de la variable número de plantas regeneradas, a partir de una hoja como tejido inicial, se muestran en el cuadro 14.

Cuadro 14. Resultados de laboratorio del número promedio de plantas regeneradas.

Woodard					Climax					Tifblue				
Dosis de 2iP (mg/l)					Dosis de 2iP (mg/l)					Dosis de 2iP (mg/l)				
3	4	5	6	7	3	4	5	6	7	3	4	5	6	7
4	0	4	5	2	3	3	5	5	1	2	3	0	3	2
4	3	4	4	3	1	3	4	5	1	3	1	0	1	2
3	3	3	0	0	1	4	0	4	2	2	0	3	1	3
4	4	3	2	0	0	4	0	0	3	0	0	1	0	3
5	3	1	3	5	0	1	3	5	4	0	2	3	0	4
4	0	1	1	5	4	2	3	3	4	3	4	4	2	1
4	4	1	1	4	4	0	5	3	4	4	0	4	3	0
3	4	2	3	4	2	2	4	4	5	3	0	0	1	0
4	3	3	4	0	1	0	0	4	5	3	3	0	4	2
4	2	4	4	1	2	3	0	1	3	1	3	0	1	0
4	2	4	3	3	0	4	1	1	3	2	4	4	0	0
4	0	0	0	3	3	5	3	2	1	2	0	3	0	3
3	0	0	0	3	3	0	0	4	1	4	3	4	3	3
5	1	3	4	4	3	0	4	3	0	3	0	1	2	4
4	3	3	1	4	4	5	4	4	3	0	3	3	2	4

A. Análisis de varianza

El análisis de varianza para la variable de respuesta número de plantas regeneradas detectó diferencias altamente significativas para las fuentes de variación variedades y dosis de 2iP; y significancia para la interacción variedades por dosis de 2iP. La interacción nos indica que el número de plantas regeneradas depende de la dosis de 2iP que se utilice en cada variedad (cuadro 15).

Cuadro 15. Análisis de varianza para la variable número de plantas regeneradas.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	F calculada	Pr > Fc
Variedad	2	25.4000	5.97	0.0029 **
Dosis de 2iP	5	39.8111	3.75	0.0027 **
Interacción Variedad por Dosis de 2iP	10	41.3536	1.95	0.0398 *
Error	252	535.7333		
Total Corregido	269	642.3000		

Pr > Fc = probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

R cuadrado = 0.1659

Coefficiente de variación = 65.28 %

Número de plantas regeneradas = 2.23

B. Interacción variedad por dosis de 2iP

El análisis de la interacción variedad por dosis de 2iP, se hizo en forma gráfica (figura 6), donde se puede observar que para la variedad Climax existe una tendencia a incrementar el número de plantas regeneradas conforme se incrementa la dosis de 2iP, cuando se utilizan dosis entre 3 y 6 mg/l de 2iP, (2.4 y 3.3 plantas regeneradas, respectivamente), mientras que para la variedad Woodard el máximo número de plantas regeneradas se produjo con 3 mg/l de 2iP (3.9 plantas regeneradas). También se puede observar, que en las dosis de 4 mg/l en adelante, existió una tendencia a incrementar el número de plantas regeneradas. Para la variedad Tifblue no se observó ninguna tendencia clara, siendo, matemáticamente, las dosis 3, 5 y 7 mg/l de 2iP las que produjeron mayor número de plantas regeneradas por lo tanto para ésta variedad no existió una tendencia clara de respuesta al 2iP.

Robles (2003) (15), en su trabajo de investigación reporta que para la variable número de plantas regeneradas la mejor variedad fue Tifblue (1.6 plantas en promedio, utilizando 10 mg/l de 2iP) a partir de brotes como tejido inicial, mientras que para la variedad Woodard obtuvo un número promedio de 1.4 plantas, utilizando 5 mg/l de 2iP, y por último, para la variedad Climax obtuvo un resultado de 1.0 plantas en promedio, utilizando 5 mg/l de 2iP, considerando estos resultados se puede decir que es mejor propagar a partir de hojas utilizando las dosis que reporta los mejores resultados para cada variedad.

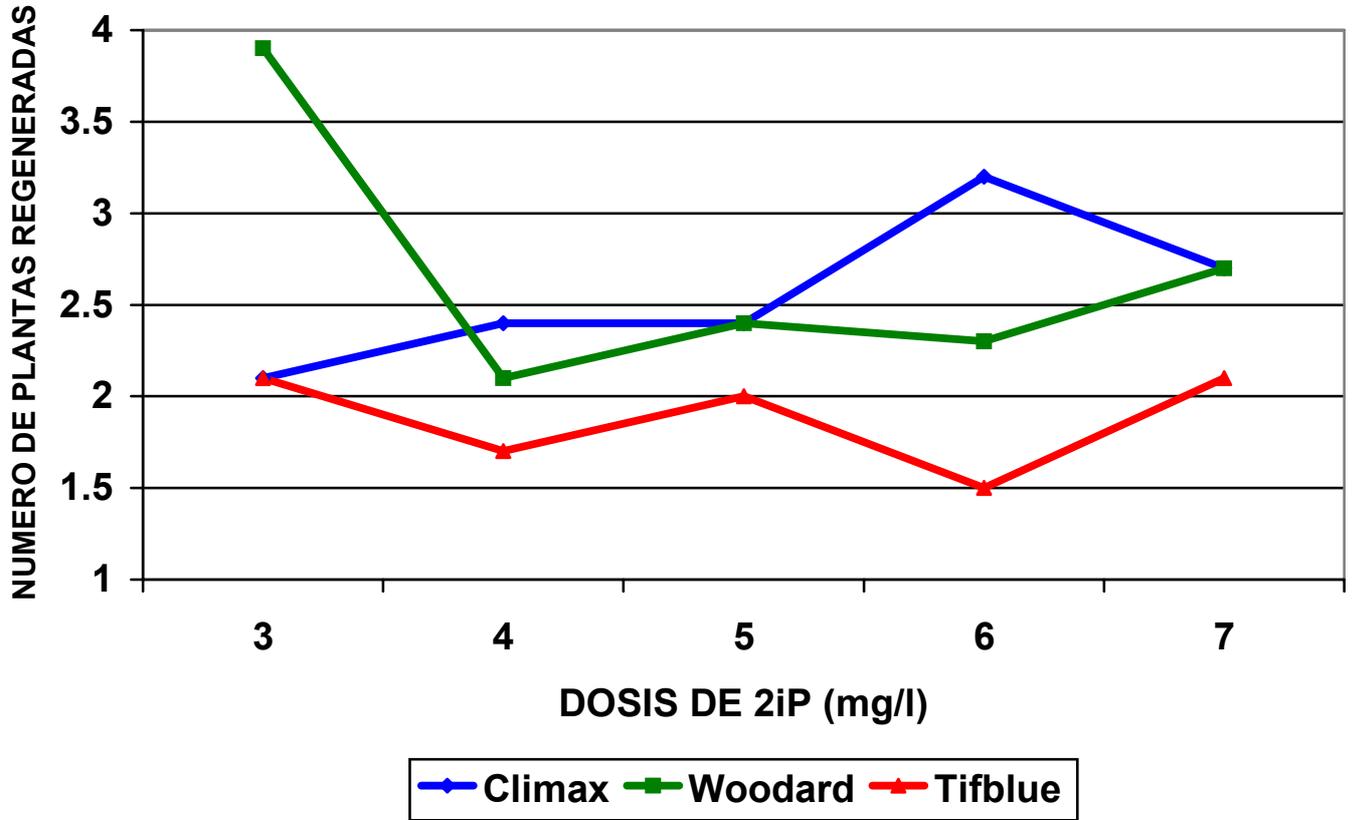


Figura 6. Interacción variedad por dosis de 2iP, para la variable número de plantas regeneradas.

7.1.5. Tasa de Propagación

La tasa de propagación consiste en la cantidad de plantas que se pueden obtener, teóricamente, en un determinado período de tiempo, a partir de un explante. En los cuadros 16, 17, 18, y figura 7, se describe el comportamiento de las variedades en relación con la dosis de 2iP y el tiempo entre cada propagación (2, 4 y 6 meses).

Cuadro 16. Número de plantas potenciales, según tasa de propagación y dosis de 2iP, utilizando hojas como explantes y diferentes intervalos entre propagaciones, para la variedad Woodard

Dosis de 2iP (mg/l)	Meses entre Propagaciones	Tiempo (meses)					
		2	4	6	8	10	12
3	2	8	32	128	512	2,048	8,192
	4		14		98		686
	6			24			192
4	2						
	4		4.0		16		64
	6			24			192
5	2	13	86	563	3,684	24,133	158,069
	4		15		120		960
	6			18			162
6	2	15	113	844	6,328	47,461	355,957
	4		20		200		2,000
	6			24			288
7	2	10	50	250	1,250	6,250	31,250
	4		14		98		686
	6			20			200

Cuadro 17. Número de plantas potenciales, según tasa de propagación y dosis de 2iP, utilizando hojas como explantes y diferentes intervalos entre propagaciones, para la variedad Climax.

Dosis de 2iP (mg/l)	Meses entre Propagaciones	Tiempo (meses)					
		2	4	6	8	10	12
3	2	10	100	1,000	10,000	100,000	1,000,000
	4		12		144		1,728
	6			15			225
4	2	8	64	512	4,096	32,768	262,144
	4		10		100		1,000
	6			13			156
5	2	10.5	110	1,158	12,155	127,628	1,340,096
	4		12		144		1,728
	6			13			
6	2	-	-	-	-	-	-
	4		28		196		1,372
	6			20			200
7	2	25.5	216.75	1,842	15,660	133,112	1,1131,449
	4		30		300		3,000
	6			36			432

Cuadro 18. Número de plantas potenciales, según tasa de propagación y dosis de 2iP, utilizando hojas como explantes y diferentes intervalos entre propagaciones, para la variedad Tifblue.

Dosis de 2iP (mg/l)	Meses entre Propagaciones	Tiempo (meses)					
		2	4	6	8	10	12
3	2	5	25	125	625	3,125	15,625
	4		8		64		512
	6			10			100
4	2	5	25	125	625	3,125	15,625
	4		7		49		343
	6			11			100
5	2	-	-	-	-	-	-
	4		5		25		125
	6			7			49
6	2	-	-	-	-	-	-
	4		6		36		216
	6			7.5			56
7	2	3.42	12	40	136	467	1,600
	4		5		25		125
	6			8			64

Se observó que con la variedad Climax, con la dosis de 5 mg/l de 2iP, propagándola cada dos meses, al llegar a un año, se obtiene una cantidad de 1,340,096 plantas, utilizando hojas como explantes, mientras que con la variedad Woodard, se obtienen 355,957 plantas, con una dosis de 6 mg/l de 2iP, utilizando también hojas como explante, propagándola cada dos meses, en el mismo período de tiempo, y por último, la variedad Tifblue, con una dosis de 2iP de 3 mg/l, se obtienen 15,625 plantas en un año, propagándola cada dos meses. Claramente se observa que las variedades responden en forma diferente a la propagación *in vitro* (figura 7).

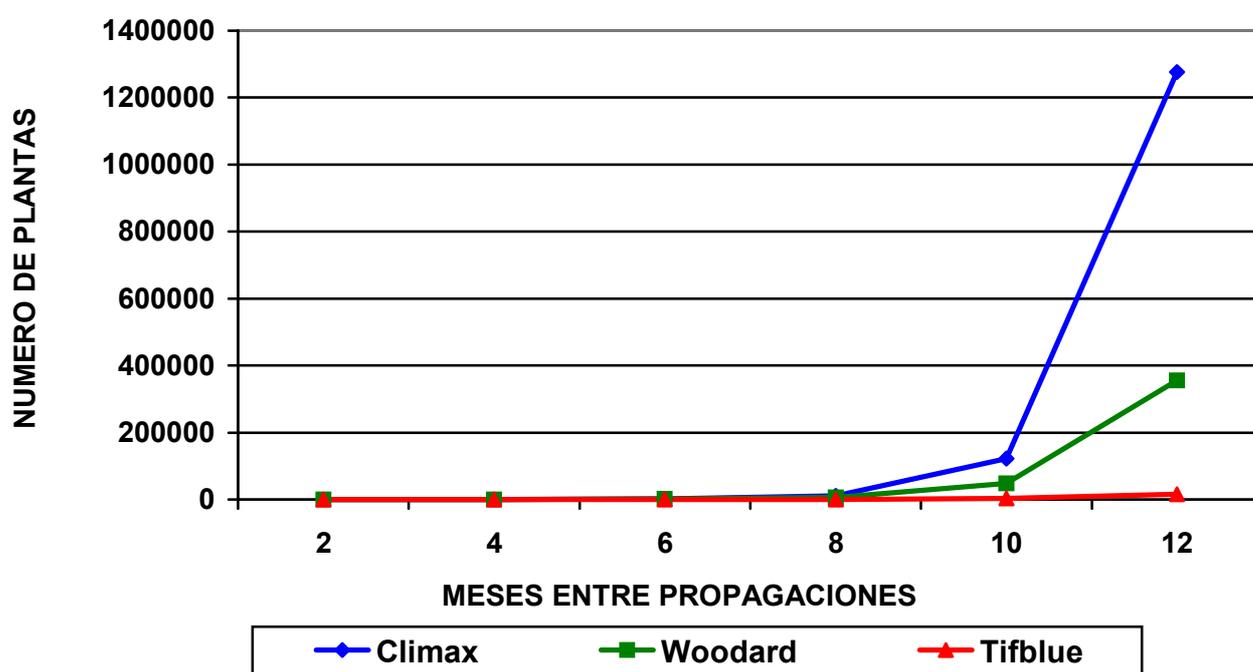


Figura 7. Número de plantas potenciales que se pueden producir utilizando la mejor dosis de 2iP para cada variedad.

Con base en los resultados obtenidos se hizo una regresión exponencial, que ajusta los datos para cada variedad (figura 8). La ecuación de regresión encontrada es la siguiente:

$$y = 2e^{0.6931x}$$

Donde:

y = número de plantas.

e = base exponencial

x = tiempo entre propagaciones (meses)

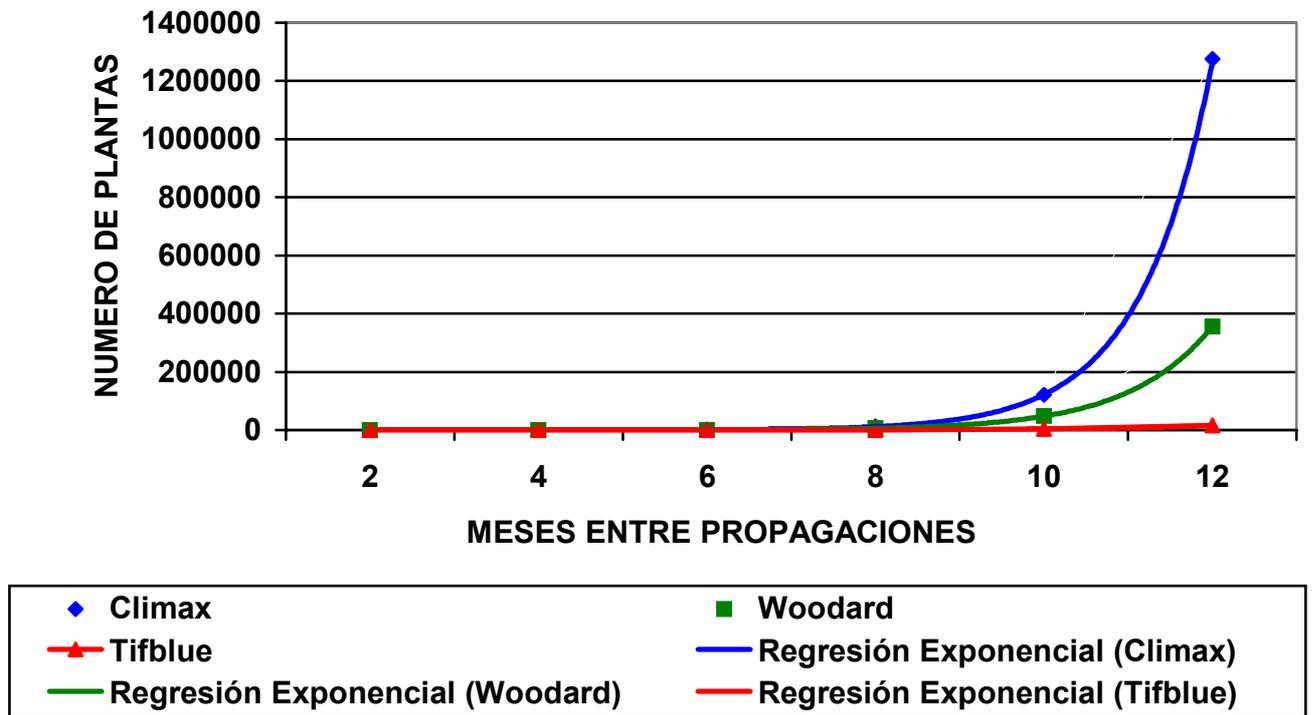


Figura 8. Regresión exponencial, para la variable tasa de propagación, utilizando la mejor dosis de 2iP para cada variedad.

7.2. Experimento II

El experimento II consistió en propagar las tres variedades de arándano utilizando microesquejes como explantes, sin la utilización de reguladores del crecimiento. Los resultados y discusión se muestran por variable de respuesta a continuación.

7.2.1. Altura de planta

Los resultados de laboratorio para la variable de respuesta altura de planta obtenidos durante el proceso de la micropropagación de las tres variedades de arándano, sin el efecto de ningún regulador de crecimiento se muestran en el cuadro 19.

Cuadro 19. Resultados de laboratorio para la variable de respuesta altura de planta (cm), utilizando microesquejes como explantes, sin reguladores del crecimiento.

Woodard	Climax	Tifblue
12	6	3.5
6	7	4
4	4	5
4	4	5
4	6	3.5
6	6	5
8	4	3.5
4	5	6
9	7	3
6	3	3.5
4	5	4.5
5	3.5	4
4	10	4.5
4	5	5
.	11	5

A. Análisis de varianza

En el análisis de varianza para la variable de respuesta altura de planta (cuadro 20) se detectó diferencias altamente significativas para la fuente de variación variedades, es decir, que la altura que pueda tener una planta está influenciada por el genotipo. Debido a lo anterior se hizo una separación de medias por medio de la prueba de Duncan al 5% (cuadro 21).

Cuadro 20. Análisis de varianza para la variable de respuesta altura de planta.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	Pr > Fc
Variedad	2	28.6175	14.3087	3.74	0.0323 *
Error	41	156.9905	3.8290		
Total Corregido	43	185.6080			

* = significativo al 5% de nivel de significancia

Pr > Fc = probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

Coefficiente de variación = 36.87%

B. Prueba de Duncan para la separación de medias de altura de planta entre variedades

La prueba de Duncan al 5% de nivel de significancia indica que de las tres variedades en estudio las variedades Climax y Woodard fueron las que produjeron mayor altura de planta (6.0 y 5.7 centímetros, respectivamente). La variedad Tifblue produjo, estadísticamente, menor altura de planta (4.2 centímetros) que las otras dos variedades, como se puede apreciar en el cuadro 21.

Cuadro 21. Prueba de Duncan para la separación de medias de altura de planta entre variedades.

Variedad	Altura de planta promedio (centímetro)	Prueba de Duncan al 5%
Climax	6.0	A
Woodard	5.7	A
Tifblue	4.2	B

7.2.2. Número de hojas

Los resultados de laboratorio del número promedio de hojas obtenidos durante el proceso de la micropropagación de las tres variedades de arándano, sin el efecto de ningún regulador de crecimiento, se muestran en el cuadro 22.

Cuadro 22. Resultados de laboratorio para la variable de respuesta número de hojas utilizando microesquejes como explante, sin reguladores del crecimiento.

Woodard	Climax	Tifblue
17	12	5
12	15	7
8	10	9
6	13	8
8	18	4
11	11	8
16	18	6
9	12	11
.	7	5
11	12	6
12	8	10
7	22	6
9	18	8
6	14	8
6	14	8

A. Análisis de varianza

En el análisis de varianza para la variable de respuesta número de hojas (cuadro 23) se detectó diferencias altamente significativas para la fuente de variación variedades, es decir, que la cantidad de hojas que pueda tener una planta está influenciada por el genotipo. Debido a lo anterior se hizo una separación de medias por medio de la prueba de Duncan al 5% (cuadro 24).

Cuadro 23. Análisis de varianza para la variable número de hojas.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	Pr > Fc
Variedades	2	276.6186	138.3093	10.92	0.0002**
Error	41	519.2905	12.6656		
Total	43	795.9091			

** = significativo al 1% de nivel de significancia

Pr > Fc = probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

Coefficiente de variación = 35.751%

B. Prueba de Duncan para la separación de medias entre variedades para la variable de respuesta número de hojas

La prueba de Duncan al 5% de nivel de significancia indica que de las tres variedades en estudio la variedad Climax fue la que produjo mayor número de hojas (13.1). Las variedades Woodard y Tifblue produjeron, estadísticamente, igual cantidad de hojas (9.1 y 7.0, respectivamente), como se puede apreciar en el cuadro 24.

Cuadro 24. Prueba de Tukey para la separación de medias entre variedades, para la variable número de hojas.

Variedad	Número de Hojas	Prueba Duncan al 5%
Climax	13.1	A
Woodard	9.8	B
Tifblue	7.0	C

7.2.3. Número de entrenudos

Los resultados de laboratorio del número promedio de entrenudos obtenidos durante el proceso de la micropropagación, mediante microesquejes, de las tres variedades de arándano, sin el efecto de ningún regulador de crecimiento, se muestran en el cuadro 25.

Cuadro 25. Resultados de laboratorio de la variable número de entrenudos, utilizando microesquejes como explante, sin reguladores del crecimiento.

Woodard	Climax	Tifblue
12	10	3
7	12	4
5	11	6
5	14	4
8	10	2
8	6	6
12	8	4
3	9	8
.	7	2
12	9	3
8	6	7
6	17	4
9	9	6
5	10	7
5	10	7

A. Análisis de varianza

El análisis de varianza para la variable de respuesta número de entrenudos (cuadro 26) detectó diferencias altamente significativas en la fuente de variación variedades, es decir, que el número de entrenudos que producen las plantas está influenciada por el genotipo. Debido a lo anterior se hizo una separación de medias por medio de la prueba de Duncan al 5% (cuadro 27).

Cuadro 26. Análisis de varianza para la variable número de entrenudos.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	Pr > Fc
Variedades	2	213.5836	106.792	15.21	0.0001 **
Error	41	287.9619	7.023		
Total	43	501.5454			

** = significativo al 1% de nivel de significancia

Pr > Fc = probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

Coficiente de variación = 36.21 %

B. Separación de medias

La prueba de Duncan al 5% de nivel de significancia indica que la variedad Climax produjo, en promedio, 9.9 entrenudos, superando a las otras dos variedades (Woodard y Tifblue), que produjeron 7.4 y 4.6 entrenudos, respectivamente), tal y como se puede observar en el cuadro 27.

Cuadro 27. Prueba de Duncan para la separación de medias entre variedades, para la variable de respuesta número de entrenudos.

Variedad	Número de Entrenudos	Prueba Duncan al 5%
Climax	9.9	A
Woodard	7.4	B
Tifblue	4.6	C

7.2.4. Número de plantas regeneradas

Los resultados que se obtuvieron para la variable de respuesta número de plantas regeneradas, utilizando microesquejes como explantes, sin reguladores del crecimiento se presentan en el cuadro 28.

Cuadro 28. Resultados de laboratorio de la variable número de plantas regeneradas, utilizando microesquejes como explantes, sin reguladores del crecimiento.

Woodard	Climax	Tifblue
2	1	1
1	2	1
1	2	1
2	1	2
1	3	2
1	1	1
2	1	1
1	3	1
0	2	1
1	2	1
1	2	2
2	3	2
2	1	2
1	1	1
1	3	1

A. Análisis de varianza

El análisis de varianza para la variable de respuesta número de plantas regeneradas (cuadro 29) detectó diferencias altamente significativas en la fuente de variación variedades, lo que nos indica que la regeneración de plantas está influenciada por el genotipo. Debido a lo anterior se hizo una separación de medias por medio de la prueba de Duncan al 5% (cuadro 30).

Cuadro 29. Análisis de varianza para la variable número de plantas regeneradas.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	Pr > Fc
Variedades	2	3.24	1.62	3.78	0.0300 **
Error	42	18.0	0.4285		
Total	44	21.24			

Pr > Fc = probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada
 Cofeciente de variación = 43.97 %

B. Separación de medias

La prueba de Duncan, al 5% de nivel de significancia (cuadro 30), nos indica que la variedad Woodard es la que regenera mayor número de plantas (2.0), en segundo lugar las variedades Climax y Tifblue, con 1.0 plantas cada una.

Cuadro 30. Prueba de Duncan para la separación de medias entre variedades, para la variable número de plantas regeneradas, utilizando microesquejes como explantes, sin reguladores del crecimiento.

Variedad	Número de Plantas Regeneradas	Prueba Duncan al 5%
Woodard	2.0	A
Climax	1.0	B
Tifblue	1.0	B

Comparador Tukey = 3.67

7.2.5. Tasa de propagación

La tasa de propagación consiste en la cantidad de plantas que se obtienen, a partir de un explante, en un determinado período de tiempo. El cuadro 31 describe el número de plantas potenciales que pueden producir cada variedad en relación con los meses entre propagaciones.

Cuadro 31. Número de plantas potenciales, utilizando microestacas como explantes, sin reguladores del crecimiento y diferentes intervalos entre propagaciones.

Variedad	Meses entre Propagaciones	Tiempo (meses)					
		2	4	6	8	10	12
Woodard	2	6.53	43	279	1,822	11,904	77,769
	4		4		64		512
	6			10			100
Climax	2	8.6	74	636	5,470	47,043	404,567
	4		10		100		1,000
	6			12			132
Tifblue	2	3.42	12	40	136	467	1600
	4		5		25		125
	6			8			64

8. CONCLUSIONES

Después del análisis y discusión de los resultados se llegó a las siguientes conclusiones.

8.1. Experimento I. Micropropagación utilizando hojas como explantes

1. La dosis de siete miligramos por litro de 2iP (2 isopentenilaminopurina) es la dosis que produce la mayor altura de planta (1.9 centímetros), en las tres variedades en estudio (Climax, Woodard y Tifblue).
2. Las dosis de siete, tres y tres miligramos por litro de 2iP fueron las dosis que produjeron el mayor número de hojas en las variedades Climax (7.2 hojas), Woodard (4.8 hojas) y Tifblue (3.0 hojas), respectivamente.
3. Las dosis de tres, siete y siete miligramos por litro de 2iP fueron las dosis que produjeron el mayor número de entrenudos en las variedades Woodard (2.9 entrenudos), Climax (2.5 entrenudos) y Tifblue (1.1 entrenudos), respectivamente.
4. La dosis de 2iP que produjo mayor número de plantas regeneradas, para la variedad Woodard, fue tres miligramos por litro (3.9 plantas por explante). Para la variedad Climax fue utilizando seis miligramos por litro de 2iP (3.3 plantas por explante). Para la variedad Tifblue lo mejor fue utilizando tres miligramos por litro de 2iP (2.2 plantas por explante).
5. La mayor tasa de propagación (10.5), en la variedad Climax, se obtuvo con la dosis cinco miligramos por litro de 2iP, propagando cada dos meses, con una cantidad potencial estimada de producción de 1,340,096 plantas en un año. Para la variedad Woodard la mayor tasa de propagación (15) se obtuvo con la dosis de seis miligramos por litro de 2iP, propagando cada dos meses, produciendo una cantidad potencial estimada de 355,957 plantas en un año. Para la variedad Tifblue la mayor tasa de propagación (5) se obtuvo de la dosis de tres miligramos por litro de 2iP, propagando cada dos meses, con una cantidad potencial estimada de 15,625 plantas en un año.

8.2. Experimento II. Micropropagación utilizando microesquejes como explantes.

1. Las alturas de planta que produjeron las variedades Climax, Woodard y Tifblue fueron 6.0, 5.7, 4.2 centímetros, respectivamente.
2. El número de hojas que produjeron las variedades Climax, Woodard y Tifblue fueron 13.1, 9.7 y 7.0, respectivamente.
3. El número de entrenudos que produjeron las variedades Climax, Tifblue y Woodard, fue de 9.9, 7.4 y 4.6, respectivamente.
4. El número de plantas que regeneran las variedades Woodard, Climax y Tifblue es de 2.0, 1.0 y 1.0, respectivamente.
5. La tasa de propagación, cada dos meses, de las variedades Woodard, Climax y Tifblue son 6.53, 8.6 y 3.42, respectivamente

9. RECOMENDACIONES

Con base en las experiencias obtenidas en la investigación se recomienda lo siguiente:

1. El procedimiento sugerido, para la propagación *in vitro* de las variedades de arándano estudiadas es el siguiente: propagar la variedad Climax, utilizando cinco miligramos por litro de 2iP (2 isopentenilaminopurina); para la variedad Woodard, utilizar seis miligramos por litro de 2iP; y, por último, para la variedad Tifblue, utilizar tres miligramos por litro de 2iP, utilizando hojas como explantes.
2. Después de la propagación por hojas se recomienda dejar crecer los explantes (dos meses como mínimo) y luego hacer subcultivos utilizando microesquejes como explantes, en el mismo medio de cultivo (Murashige y Skoog, 1962), sin reguladores del crecimiento, hasta obtener la cantidad de plantas deseada.
3. En una posteriormente investigación se deberá encontrar un regulador del crecimiento, del grupo de las auxinas (por ejemplo: ácido indolbutírico, ácido indolacético, ácido naftalenacético, ácido naftoxacético, entre otros), en una dosis adecuada, para tratar de producir el desarrollo *in vitro* de raíces, para, finalmente, poder trasladar las plántulas producidas *in vitro* a un invernadero, para su aclimatación, y así contar con el protocolo completo para el establecimiento, propagación, enraizamiento y aclimatación del arándano.
4. Finalmente, se recomienda evaluar otros medios de cultivos, para la variedad Tifblue, para tratar de mejorar su tasa de propagación, debido a que es muy baja, respecto a las otras dos variedades.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrobit, AR. 2002. El cultivo de arándano (en línea). Córdoba, Argentina. Consultado 22 may. 2002. Disponible en http://26.agrobit.com/Info_tecnica/alternativos/horticultura/AL_000001ho.htm
2. Berrior, A; Berthouly, M. 1987. Tecnología del cultivo de tejidos de café: medios y métodos de cultivos *in vitro*. s.n.t. 37 p. (Manual 2).
3. Bidwell, RGS. 1990. Fisiología vegetal. Trad. Guadalupe Jerónimo Cano y Cano y Manuel Rojas Garcidueñas. México, AGT Editor. p. 148-149.
4. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CO). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Ed. por Roca, WM y Mroginski, LA. Cali, Colombia. p. xii, 970.
5. Cronquist, A. 1981. An Integrated system of clasification of flowering plants. US, University Press. 1,262 p.
6. George, EF. 1996. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. Londres, Exegetics. 1333 p.
7. Gil, G. 1997. El potencial productivo, crecimiento vegetativo, diseño de huerto y viñedos (en línea). Santiago, Chile, Universidad Católica, Facultad de Agronomía. Consultado 15 abr. 2002. Disponible en <http://26.geocities.com/Athens/Sparta/4704/arandano.htm>
8. Hartmann, HT. 1984. Propagación de plantas: principios y prácticas. México, CECSA. p. 639-636.
9. Hurtado, MD; Merino, ME. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 232 p.
10. Kyte, L; Klein, J. 1996. Plants from test tubes: an introduction to micropropagation. 3 ed. Portland, Oregon, US, Timber Press. p. 191-192.
11. Lamb, D. 1973. High blueberries: a new fruit for Europe. Hort. Soc. 6:401-404.
12. Litz, RE; Jarret, RL. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogéneis. *In* CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CO). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Ed. por Roca WM y Mroginski, LA. Cali, Colombia. p. 143-172.
13. Lloyd, G; M^ccown, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmico latifolia* by use of shoot tip culture. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 30:421-427.
14. Puttock, DJM; George, EF; George, HJ. 1997. Plant culture media: formulations and uses. Londres, Exegetics. v. 1, 567 p.

15. Robles Spillari, SG. 2003. Efecto de cinco dosis de 2-isopenteniladenina, sobre la micropropagación de seis variedades de arándano (*Vaccinium ashei* R.). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 79 p.
16. Rosell, CH; Villalobos, VM. 1990. Fundamento teórico-práctico del cultivo de tejidos vegetales. Roma, FAO. 113 p.
17. Thomas, CM. 1979. Biochemistry and physiology of plant hormones. Berlín, Springer-Verlag. 274 p.
18. Usui, K; Okabe, K; Victores, R; Ramirez, AE. 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Guatemala. ICTA / JOCV. 166 p.
19. Valdeti, L. 2001. Primer encuentro nacional de diversificación Agrícola. Guatemala, AGEXPRONT. p. 203-214.
20. Vanerwegen, J; Kremer, G. 1991. Improve blueberry set with gibberellic acid en (línea). American Fruit Grower 111(2):30. Consultado 15 abr. 2002. Disponible en <http://26.geocities.com/Athens/Sparta/4704/arandano.htm>
21. Villalobos, VM; Thorpe, TA. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *In* Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Roca, WM y Mroginski, LA (eds.). Cali, Colombia. p. 127-141.
22. Vuylsteke, DR. 1989. Shoot-tip culture for propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. Roma, Italia, International Board for Plant Genetic Resources. 56 p.
23. Weaver, RJ. 1987. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. México, Trillas. 622 p.
24. Zimmerman, RH; Roome, OC. 1980. Blueberry micropropagation. *In* Zimmerman, RH (ed.). s.f. Proc. of the conf. on nursery production of fruit plants through tissue culture: applications and feasibility. US, USDA-SEA, Agr. Res. Results ARR-NE- II. p. 44-47.

11. ANEXOS

Cuadro 32A. Medio de cultivo WPM (Woody Plant Media) de Lloyd y M^cCown (1981).

Macroelementos (mg/l) de Lloyd y M ^c Cown (WPM, 1981)	
NH ₄ NO ₃	400
Ca(NO ₃) ₂ · 2H ₂ O	556
CaCl ₂ · 2H ₂ O	96
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microelementos (mg/l) de Lloyd y M ^c Cown (WPM, 1981)	
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25
NaMoO ₄ · 7H ₂ O	0.25
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
NaEDTA · 2H ₂ O	37.3
Vitaminas (mg/l) de Mullin <i>et al.</i> (1997)	
Tiamina-HCl	0.1
Acido nicotínico	0.5
Piridoxina-HCl	0.5
Glicina	2.0
Otros (mg/l)	
Myo-inositol	100
Phytigel	2,000
Sacarosa	30,000
pH	5.8

Cuadro 33A. Costo estimado de un litro de medio de cultivo WPM, según dosis de 2iP.

Dosis de 2iP (mg/l)	Costo (US\$)
5	4.84
10	4.89
15	4.94
20	4.99
25	5.04