

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y
BIOTECNOLOGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



Desarrollo de un protocolo para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano de arbusto alto) variedad Misty, a partir de segmentos nodales en un Reactor de Inmersión Temporal

PRESENTADO POR LOS BACHILLERES:

CALISAYA AZPILCUETA, Daniel Alejandro

ESPINOZA VILLEGAS, Gilda Elizabeth

ASESOR:

Ing. CINTHYA CÓRDOBA BARRIOS

AREQUIPA - PERÚ

2014

AGRADECIMIENTOS

Antes que a todos queremos agradecer a Dios por darnos las fuerzas necesarias en los momentos en que más las necesitamos.

A nuestra asesora la Ing. Cinthya Córdoba Barrios por su dedicación y por los conocimientos brindados a lo largo de la realización de nuestro proyecto de tesis.

A nuestros familiares y amigos que estuvieron constantemente alentándonos a seguir adelante y perseverar con el desarrollo de este proyecto de tesis.



INDICE

RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	15
CAPITULO I: INTRODUCCION	17
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 Objetivo General	19
1.1.2 Objetivos específicos	19
1.2 HIPÓTESIS	20
CAPITULO II: MARCO TEORICO.....	21
2.1 ARÁNDANO.....	21
2.1.1 Clasificación Taxonómica.....	21
2.1.2 Arándano de arbusto alto	22
2.1.3 Cultivo del arándano	24
a) Propagación por esquejes.....	24
b) Requerimientos edafoclimáticos	25
c) Requerimientos nutricionales.....	25
d) Plagas y enfermedades	26
2.1.4 Distribución y Producción Mundial.....	29
2.1.5 Mercado para el Arándano	31
2.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES “IN VITRO”	32
2.2.1 Cultivo in vitro	32
2.2.2 Micropropagación	32
a) Cultivo de Segmentos Nodales	33
b) Fases de la Micro propagación.....	33
2.2.3 Medio de cultivo	34
a) Componentes de los medios de cultivo.....	35
2.2.4 Métodos de esterilización.....	42
a) Agentes físicos	42
b) Agentes mecánicos.....	42
c) Agentes químicos	43
2.2.5 Condiciones ambientales para la incubación	43

2.2.6	Problemas en el cultivo in vitro	43
2.2.7	Ventajas y desventajas de la Micropropagación.....	48
2.2.8	Cultivo de tejidos del arándano.....	49
2.3	REACTORES EN CULTIVO IN VITRO	50
2.3.1	Tipos de Reactores	51
a)	Agitación Mecánica.....	51
b)	Agitación vibratoria.	52
c)	Agitación con tambores giratorios.	52
d)	Agitación con filtro giratorio.	52
e)	Reactor en Fase gaseosa o líquida dispersa.....	52
f)	Agitación neumática.	53
2.3.2	Aspectos importantes de los sistemas RITA®.....	53
2.3.3	Reactores Twin flasks	56
2.3.4	Ventajas de un Reactor de inmersión temporal.....	57
CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....		59
3.1	MATERIALES	59
3.1.1	Material vegetal.....	59
3.1.2	Material de laboratorio.....	60
a)	Equipos.....	60
b)	Material de vidrio.....	60
c)	Reactivos	61
d)	Otros.....	62
3.2	MÉTODOS	63
3.2.1	Localización del ensayo	63
3.2.2	Preparación de Soluciones Stock para el medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium).....	63
3.2.3	Recolección del material vegetal	63
3.2.4	Establecimiento in Vitro	65
a)	Preparación del medio de cultivo.....	65
b)	Desinfestación superficial de los explantes.....	66

3.2.5	Evaluación del efecto los reguladores de crecimiento citocinina 2-iP (6 (γ,γ- dimetilalilamino) purina) y auxina ANA (Ácido naftalen acético) en el desarrollo de brotes de <i>Vaccinium corymbosum</i> L. variedad Misty	68
3.2.6	Diseño construcción del reactor de inmersión temporal	70
a)	Preparación del medio de cultivo liquido.....	70
b)	Diseño del Reactor de Inmersión Temporal.....	71
3.2.7	Determinación de la frecuencia y el tiempo de inmersión óptimos para el desarrollo de los explantes de <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cultivar Misty.	72
3.2.8	Evaluación del Enraizamiento in vitro	73
3.3	DIAGRAMA DE ACTIVIDADES	75
CAPITULO IV: RESULTADOS.....		76
4.1	DESINFESTACIÓN SUPERFICIAL DEL MATERIAL VEGETAL.	76
4.2	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO CITOQUININA (2-IP) Y AUXINA (ANA) EN EL DESARROLLO DE BROTES AXILARES DE <i>VACCINIUM CORYMBOSUM</i> L. VARIEDAD MYSTI.....	79
4.2.1	Análisis de la altura de los brotes.....	79
4.2.2	Análisis del Número de Hojas	83
4.2.3	Análisis en la Formación de callos.....	86
4.2.4	Análisis del coeficiente de multiplicación en la etapa de la multiplicación in vitro	88
4.3	DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL REACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL.	89
4.3.1	Funcionamiento del reactor.....	90
4.3.2	Evaluación de la frecuencia y el tiempo de inmersión.....	91
4.3.3	Evaluación de la altura promedio de los explantes desarrollados en los Reactores de Inmersión Temporal	93
4.3.4	Evaluación del promedio en el número de hojas desarrolladas en los Reactores de Inmersión Temporal	94
4.3.5	Coeficientes de multiplicación en el reactor de inmersión temporal	96
4.4	ENRAIZAMIENTO IN VITRO	98

CONCLUSIONES	100
RECOMENDACIONES	101
REFERENCIAS.....	102
APENDICES.....	108



ABREVIATURAS

AIA: Acido Indolacetico

ANA: Acido Naftalenacético

BAP: 6-Bencilaminopurina

2-iP: 2-Isopenteniladenina

IAA: Acido indol-3-acetico libre de acido

2,4-D: Acido 2.4-Diclorofenoxiacetico

PCA: Acido paraclorofenoxiacético

AG₃: Acido Giberelico

RITA®: Reactor de Inmersión Temporal Automatizado

WPM: Medio Lloyd McCown 1980.

CM: Coeficiente de Multiplicación

ELISA: Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay

INDICE DE TABLAS.

- Tabla N° 1:** Producción mundial en 2003 de arándanos “highbush” y “rabbiteye”.
- Tabla N° 2:** Área cultivada de arándanos en Perú
- Tabla N° 3:** Tratamientos de desinfestación evaluados.
- Tabla N° 4:** Tratamientos utilizados en la fase de multiplicación.
- Tabla N° 5:** Tratamientos para la evaluación de la frecuencia y el tiempo de inmersión.
- Tabla N° 6:** Tratamientos para la inducción del enraizamiento de *Vaccinium corymbosum* L. variedad Misty
- Tabla N° 7:** Porcentaje de segmentos nodales de *V. corymbosum* variedad Misty no contaminados y contaminados después del tratamiento con 3 diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio.
- Tabla N° 8:** Promedios de la altura (cm) de los brotes de *Vaccinium corymbosum* L. variedad Misty desarrollada según tratamiento (concentración de 2-iP y ANA)
- Tabla N° 9:** Grupos estadísticos de la altura (cm) de los brotes de *Vaccinium corymbosum* L. variedad Misty desarrollada según tratamiento (concentración de 2-iP y ANA).
- Tabla N° 10:** Número de hojas por brote de *Vaccinium corymbosum* L. variedad Misty desarrollada según tratamiento (concentración de 2-iP y ANA)
- Tabla N° 11:** Grupos estadísticos para el número de hojas por brote de *Vaccinium corymbosum* L. variedad Misty desarrollada según tratamiento (concentración de 2-iP y ANA)
- Tabla N° 12:** Coeficientes de multiplicación de los brotes de *Vaccinium corymbosum* L. variedad Misty desarrollada según tratamiento (concentración de 2-iP y ANA) a los 60 días de cultivo.
- Tabla N° 13:** Promedio de la altura de los explantes de acuerdo al tiempo y la frecuencia de inmersión.

Tabla N° 14: Promedio del número de hojas de los explantes de acuerdo al tiempo y la frecuencia de inmersión.



INDICE DE FIGURAS

- Figura N° 1:** Plantas de arándano de arbusto alto (highbush).
- Figura N° 2:** Partes de una planta de arándano
- Figura N° 3:** Frutos de arándano Misty.
- Figura N° 4:** Enraizamiento de esquejes de arándano en perlita y turba.
- Figura N° 5:** Funcionamiento de un sistema RITA ®. En cuatro etapas.
- Figura N° 6:** Partes de un sistema Rita
- Figura N° 7:** Funcionamiento de los reactores twinflasks
- Figura N° 8:** Planta madre de arándano de 1 año de edad
- Figura N° 9:** Explantes de Arándano Misty utilizados en la investigación
- Figura N° 10:** Procedimiento seguido para la multiplicación de brotes. A) Extracción de los explantes en la cámara de flujo laminar. B) Corte de los brotes en segmentos nodales de aproximadamente 1 cm. C) Siembra en el medio de cultivo. D) Sellado de los tubos de ensayo.
- Figura N° 11:** Reactor de inmersión temporal automático (RITA®)
- Figura N° 12:** Partes principales del reactor de inmersión temporal automatizado.
- Figura N° 13:** Explantes de arándano a los 10 días de cultivo
- Figura N° 14:** Efecto de los diferentes tratamientos de desinfestación en el % de explantes viables, % de explantes contaminados con bacterias y % de explantes contaminados con hongos.
- Figura N° 15:** Explantes de arándano Misty a los 30 días después del establecimiento *in vitro*.

Figura N° 16: Efecto de la auxina (ANA) y citocinina (2-iP) en la altura de los brotes en la fase de multiplicación *in vitro*.

Figura N° 17: Explantes de arándano Misty a los 60 días de cultivo en medio WPM.

Figura N° 18: Comparación del efecto de citocinina (2-iP) y de auxina (ANA) en la altura de los brotes en la fase de multiplicación *in vitro*.

Figura N° 19: Efecto de la auxina (ANA) y citocinina (2-iP) el número de hojas por brote en la fase de multiplicación *in vitro*.

Figura N° 20: Porcentaje de plántulas con formación de callo para cada tratamiento (concentración de 2-iP y ANA).

Figura N° 21: Explante de arándano Misty con formación de callo

Figura N° 22: Comparación de los coeficientes de multiplicación (número de yemas final/ número de yemas inicial) obtenidos con diferentes concentraciones de 2-iP y ANA a los 60 días de cultivo.

Figura N° 23: Partes del reactor de inmersión temporal. A) recipiente principal. B) Tapa. C) Filtros de espuma. D) Tubo central. E) Recipiente inferior. D) Recipiente de cultivo.

Figura N° 24: Funcionamiento simultaneo de nueve reactores de inmersión temporal con sus respectivos temporizadores y bombas de aire.

Figura N° 25: Diferencia entre los filtros de espuma introducidos a presión y los filtros de aire marca INTERSURGICAL

Figura N° 26: Funcionamiento del reactor de inmersión temporal.

Figura N° 27: Desarrollo de explantes de arándano en el reactor de inmersión temporal .A) Inicio del cultivo B) Fin del cultivo 60 días.

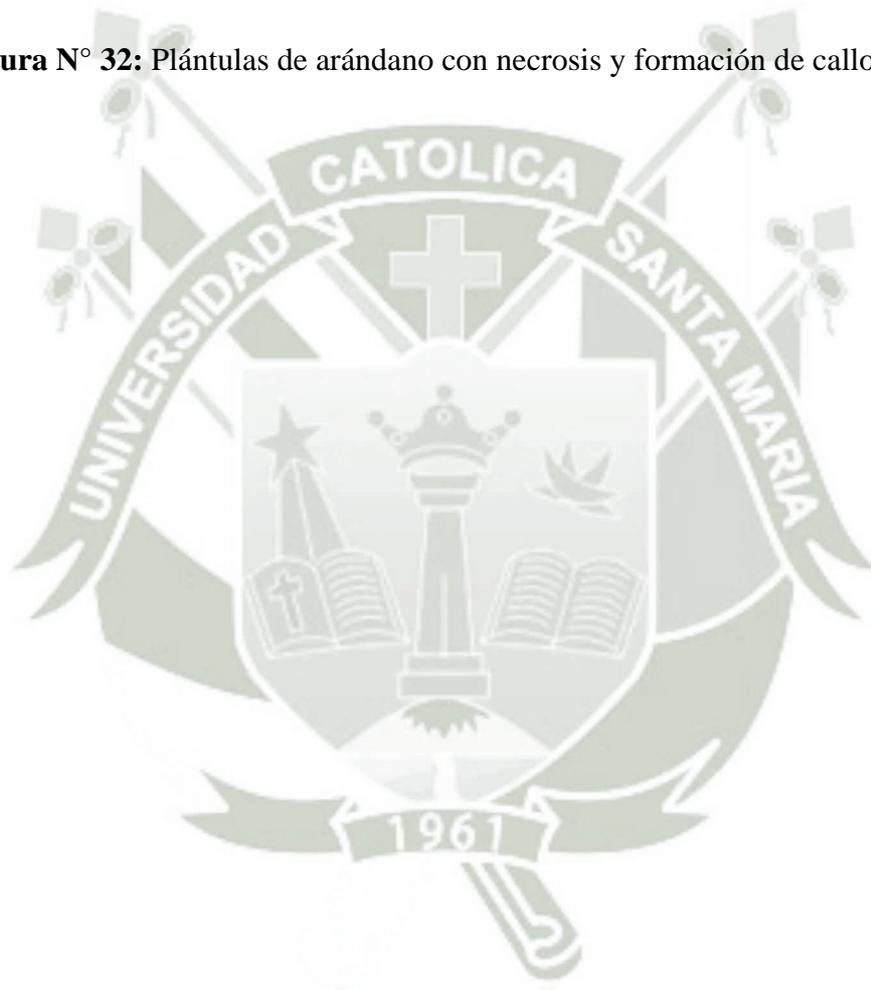
Figura N° 28: Explantes de arándano al finalizar el cultivo en los reactores de inmersión temporal.

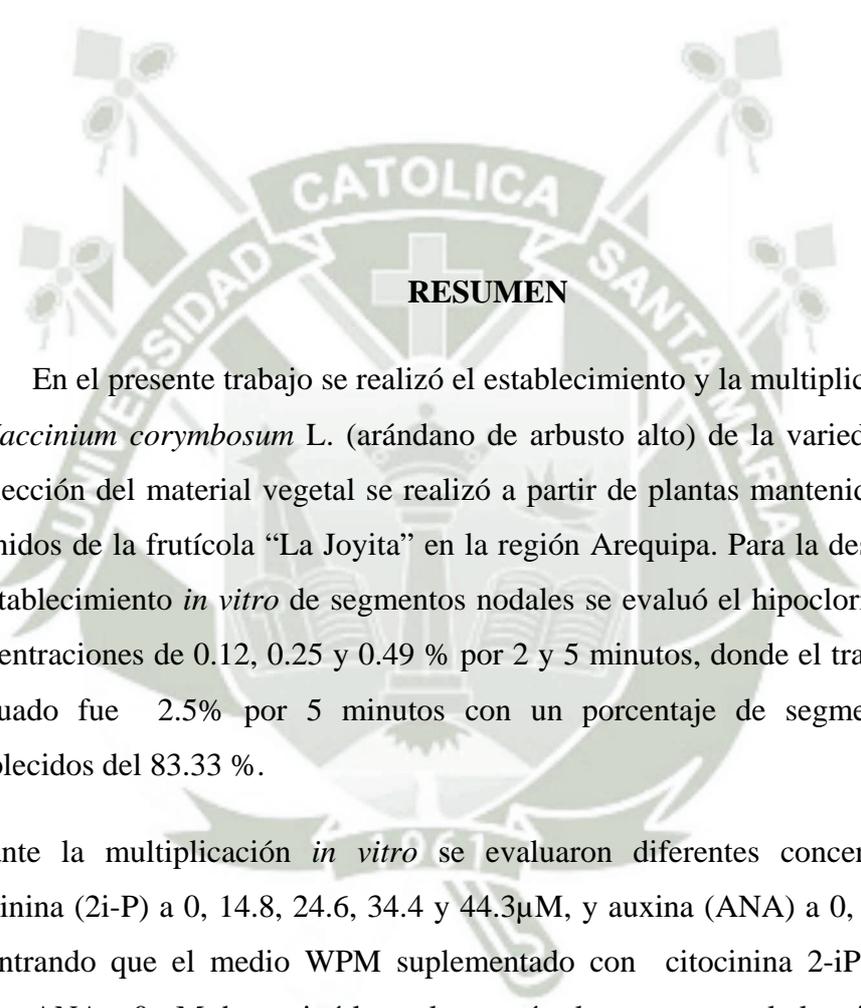
Figura N° 29: Evaluación de cada uno de los tiempos de inmersión con respecto a las frecuencias de inmersión para la altura de los explantes.

Figura N° 30: Evaluación de cada uno de los tiempos de inmersión con respecto a las frecuencias de inmersión para el número de hojas de los explantes.

Figura N° 31: Comparación de los coeficientes de multiplicación (número de yemas final/ número de yemas inicial) obtenidos con diferentes tiempos de inmersión y diferentes frecuencias de inmersión.

Figura N° 32: Plántulas de arándano con necrosis y formación de callos





RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L. (arándano de arbusto alto) de la variedad Misty. La recolección del material vegetal se realizó a partir de plantas mantenidas en vivero, obtenidos de la frutícola “La Joyita” en la región Arequipa. Para la desinfestación y el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales se evaluó el hipoclorito de sodio a concentraciones de 0.12, 0.25 y 0.49 % por 2 y 5 minutos, donde el tratamiento más adecuado fue 2.5% por 5 minutos con un porcentaje de segmentos nodales establecidos del 83.33 %.

Durante la multiplicación *in vitro* se evaluaron diferentes concentraciones de citocinina (2i-P) a 0, 14.8, 24.6, 34.4 y 44.3 μ M, y auxina (ANA) a 0, 2.7 y 5.4 μ M encontrando que el medio WPM suplementado con citocinina 2-iP a 34.4 μ M y auxina ANA a 0 μ M determinó los valores más altos tanto para la longitud promedio de brotes(3.5 centímetros), número de hojas desarrolladas (8 hojas/brote) y coeficiente de multiplicación (9).

Se diseñó un reactor de inmersión temporal basado en el sistema RITA®, impulsado por una bomba de aire de 2 W de potencia, generando un flujo de 3 L/min, sellado con filtros de esponja a presión, tanto para la entrada como para la salida del reactor

para mantener la esterilidad. El reactor contenía 500 mL de medio WPM líquido, alcanzando una altura de 4 cm es estado de reposo y 7 cm en estado de inmersión. El tiempo que tomo el reactor para llegar al estado de inmersión fue de 30 segundos.

Se cultivaron explantes procedentes del medio de cultivo sólido en reactores de inmersión temporal con tiempos de inmersión de 1, 3 y 6 minutos; y frecuencias de inmersión de 2, 4 y 8 veces al día; el medio fue suplementado con $34.4\mu\text{M}$ de 2-iP y $0\mu\text{M}$ de ANA. A los 60 días de cultivo se determinó que la frecuencia de inmersión de 4 veces al día durante 1 minuto produjo los valores más elevados de altura (6.2 cm), mientras que con una frecuencia de inmersión de 8 veces al día durante 1 min se obtuvieron los valores más elevados en el número de hojas (14.2 hojas/brote) y el coeficiente de multiplicación (21.8).

Con el reactor se logró incrementar en 2.4 veces el coeficiente de multiplicación *in vitro* que se alcanzó en medio sólido. Estos resultados sugieren que el uso de un reactor de inmersión temporal puede mejorar la respuesta de los explantes de arándano de la variedad Misty y aumentar su coeficiente de multiplicación *in vitro* cuando son cultivados en condiciones controladas.

Además se evaluó el efecto del ácido naftalen-acético (ANA) en el medio de cultivo WPM sobre el enraizamiento *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L. para lo cual se empleó cuatro concentraciones del regulador de crecimiento (10.7, 16.1, 21.5, 26.9 y $32.2\mu\text{M}$) y se encontró que estas concentraciones produjeron la formación de callos y la necrosis de los microtallos en su totalidad.

Palabras Clave: Arándano, Establecimiento, multiplicación, reactor de inmersión temporal, segmentos nodales.

ABSTRACT

In this study the *in vitro* establishment and multiplication of *Vaccinium corymbosum* L. (highbush blueberry) was performed of Misty variety. Harvesting of plant material was kept from greenhouse plants, obtained from "LaJoyita" in the Arequipa region. For disinfestation and establishment of *in vitro* nodal segments sodium hypochlorite at concentrations of 0.12, 0.25 and 0.49 % for 2 to 5 minutes, where the best treatment was 2.5 % for 5 minutes with a set percentage of nodal segments was assessed of 83.33%.

During the *in vitro* proliferation of different cytokinin concentrations (2i-P) at 0, 14.8, 24.6, 34.4 and 443 μ M, and auxin (NAA) at 0, 2.7 and 5.4 μ M were evaluated and found that WPM medium supplemented with 2 -iP cytokinin to 34.4 μ M and auxin NAA at 0 μ M highest values determined for both the average shoot length (3.5 cm), the number of expanded leaves (8 sheets/sprout) and multiplication coefficient (9).

Reactor based on temporary immersion RITA ® system, powered by an air pump power of 2 W, generating a flow of 3 L / min , sealed pressure sponge filters for both input and is designed for reactor outlet to maintain sterility . The reactor containing 500 mL of liquid WPM medium , reaching a height of 4 cm is idle and 7 cm in a state of immersion. The time taken to reach the reactor to immersion was 30 seconds.

Cultured explants from the solid medium in reactors temporary immersion with immersion times of 1, 3 and 6 minutes, and frequencies of immersion of 2, 4 and 8 times per day , the medium was supplemented with 34.4 μ M 2 -iP and 0 μ M NAA . At 60 days of culture was determined that the rate of immersion of 4 times daily for 1 minute produced the highest values of height (6.2 cm) , while a frequency of immersion of 8 times per day for 1 min were obtained the higher values in the number of leaves (14.2 leaves / shoot) and the multiplication coefficient (21.8) .

With the reactor was able to increase by 2.4 times the rate of *in vitro* multiplication was achieved on solid medium. These results suggest that the use of a temporary immersion reactor may improve the response of the explants of variety Misty cranberry and increase its coefficient multiplication *in vitro* when they are grown under controlled conditions.

Besides the effect of naphthalene acetic acid (NAA) in the culture medium on WPM rooting in vitro was evaluated *Vaccinium corymbosum* L. Four concentrations for which growth regulator (10.7, 16.1, 21.5, 26.9 y 32.2 μM) was used and found that these concentrations produced calluses and necrosis microshoots entirely.

Keywords: Blueberry, Establishment, multiplication, reactor temporary immersion, nodal segments.



CAPITULO I: INTRODUCCION

Vaccinium corymbosum L.(arándano de arbusto alto) es un frutal menor perenne, perteneciente al grupo de los “berries”, que ha alcanzado una gran importancia para la agricultura de nuestro país. Es una fruta muy apreciada, no solo por su delicioso sabor y llamativo color, sino por sus características nutricionales y relacionadas con la mejora de la salud (Contreras, 2010). Es considerado como un fruto con alto valor antioxidante, libre de grasas, colesterol, rico en fibras, astringente, diurético y además contiene vitamina A y C; lo que determina que sea una fruta con muchas características deseables desde el punto de vista nutricional (Carrera, 2012).

La producción mundial se concentra básicamente en Norteamérica, sin embargo se observa que la producción en los países del hemisferio sur se ha incrementado, siendo Sudamérica la zona de producción que más ha crecido durante la última década. Este cultivo se introdujo en Perú en los años 80 destinado principalmente al mercado nacional. La alta demanda en los mercados del hemisferio norte, unida a la alta rentabilidad de su cultivo, han motivado una gran expansión de la superficie plantada en nuestro país de aproximadamente 200 ha en la actualidad (Sierra Exportadora, 2013), que se distribuyen principalmente en Arequipa, Cajamarca, Ancash, Lambayeque, La Libertad y la sierra de Lima. Esta expansión ha permitido que Perú introduzca al arándano en su oferta exportable siendo el destino principal Estados Unidos donde el consumo de arándanos es 760 gramos per cápita.

Entre las variedades cultivadas de arándano en el Perú, las cultivadas en la región Arequipa son: Misty, Biloxi, Legacy y Oneil; estas variedades fueron seleccionadas debido a su fácil adaptación al clima y al suelo de Arequipa. En el presente trabajo de investigación se ha seleccionado la variedad Misty debido a su bajo requerimiento de frío, tolerancia a suelos salinos y alta producción del fruto de aproximadamente 18 ton /ha (Redagricola, 2012)

El aumento en la superficie cultivada de arándanos desde sus inicios hasta la fecha, ha producido un incremento en la demanda de plantas de buena calidad, lo cual se traduce en un mejoramiento del sistema tradicional de propagación y el uso de

nuevas técnicas de producción de plantas, como es el uso de herramienta biotecnológicas, como la micropropagación.

El arándano se propaga tradicionalmente por enraizamiento de estacas. Sin embargo, esta forma de propagación tiene una serie de complicaciones, traducidas en un bajo porcentaje de enraizamiento, escaso desarrollo radical, menor desarrollo lateral debido a que no forman coronas, y por lo tanto el número de ramas productivas es limitado. Es por esto que se recurre a la técnica de micropropagación ya que los brotes *in vitro* tienden a una mayor brotación lateral y producen más botones florales por planta, aumentando así el potencial productivo (Rache & Pacheco, 2010). Además, esta técnica permite propagar material libre de enfermedades y asegurar la producción de plantas genéticamente idénticas a la madre.

El presente trabajo de investigación tiene por objetivo establecer una metodología de propagación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L. (arándano de arbusto alto) variedad Misty en un reactor de inmersión temporal, el cual consta de un sistema automatizado reduciendo el uso de la mano de obra y permitiendo la propagación de plantas genéticamente iguales, en menor tiempo y espacio reducido, aplicando estímulos por medio de variables físicas y químicas controladas.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

Desarrollar un protocolo para el establecimiento y multiplicación de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano de arbusto alto) variedad Misty, a partir de segmentos nodales en un reactor de inmersión temporal.

1.1.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar el tiempo y la concentración de hipoclorito de sodio óptimos para obtener el mayor número de explantes viables en el establecimiento *in vitro* en medio WPM de segmentos nodales de *Vaccinium corymbosum* L. (arándano de arbusto alto) variedad Misty.
- 2) Evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento 2-iP y ANA a diferentes concentraciones en el desarrollo de brotes axilares de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano de arbusto alto) variedad Misty en medio WPM.
- 3) Diseñar un reactor de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano de arbusto alto) variedad Misty.
- 4) Determinar la frecuencia y el tiempo de inmersión para el mejor desarrollo de los explantes de *Vaccinium corymbosum* L. (arándano de arbusto alto) variedad Misty en medio WPM.
- 5) Evaluar el efecto del regulador de crecimiento ANA en el enraizamiento de explantes *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano de arbusto alto) variedad Misty..

1.2 Hipótesis

Debido a que *Vaccinium corymbosum* L.(arándano de arbusto alto) variedad Misty es una planta de reproducción vegetativa es posible el empleo de la micropropagación en un sistema de inmersión temporal utilizando segmentos nodales para incrementar la tasa de multiplicación y obtener plantas genéticamente iguales a la planta madre, de manera eficiente, rápida y en menor espacio.



CAPITULO II: MARCO TEORICO

2.1 ARÁNDANO

2.1.1 Clasificación Taxonómica

De acuerdo con Cronquist (1981), el arándano pertenece a la Familia *Ericaceae*, Genero *Vaccinium*, constituido por cinco especies: *V. corymbosum* L. (Highbush), *V. ashei* Reade (Rabbiteye), *V. myrtulloides* Mitchx (Lowbush), *V. angustifolium* Ait (Lowbush) y *V. briitonii* Port. Ex Brickn (Lowbush).

Las especies de mayor importancia comercial son el arándano de arbusto alto *V. corymbosum* L. (Highbush), arándano de arbusto bajo *V. angustifolium* Ait (Lowbush) y arándano ojo de conejo *V. ashei* Reade (Rabbiteye) (Moore y Ballington, 1997).

Dentro de los nombres comunes del arándano tenemos los siguientes (Hancock y Draper, 1989):

- Castellano: mirtilo, arandilla, arandanera, arándano.
- Francés: myrtille.
- Inglés: bilberry, blueberry



Figura N° 1: Plantas de arándano de arbusto alto (highbush).

Obtenido de: Blueberries Chile

2.1.2 Arándano de arbusto alto

Las variedades plantadas en Perú son en su mayoría del tipo arbusto alto, pertenecientes a la especie *Vaccinium corymbosum* L. Es una planta tetraploide mayoritariamente cultivada en la zona este de Estados Unidos. El arándano alto es un arbusto perenne, longevo, caducifolio (que no mantiene las hojas durante todo el año), con madera leñosa que puede alcanzar una altura de 2.5 m en estado adulto, y sus tallos pueden tener una actividad productiva de 4 a 5 años. El sistema radical del arándano está compuesto de finas raíces, que presentan un desarrollo superficial y de poca extensión, desprovisto de pelos radicales, de modo que la absorción es realizada principalmente por raíces jóvenes. Las hojas son alternas, cortamente pediceladas. (Contreras, 2010).

Tanto los tallos como las hojas están cubiertos por un polvo blanquecino llamado pruina cenicienta. Las flores, miden de 2 a 3 cm de diámetro y son de color blanco o rosado. El fruto es una baya de forma larga y cónica, al principio es de color verde, después rojo y al final se vuelve negro cuando alcanza la madurez (Buzeta A., 1997).

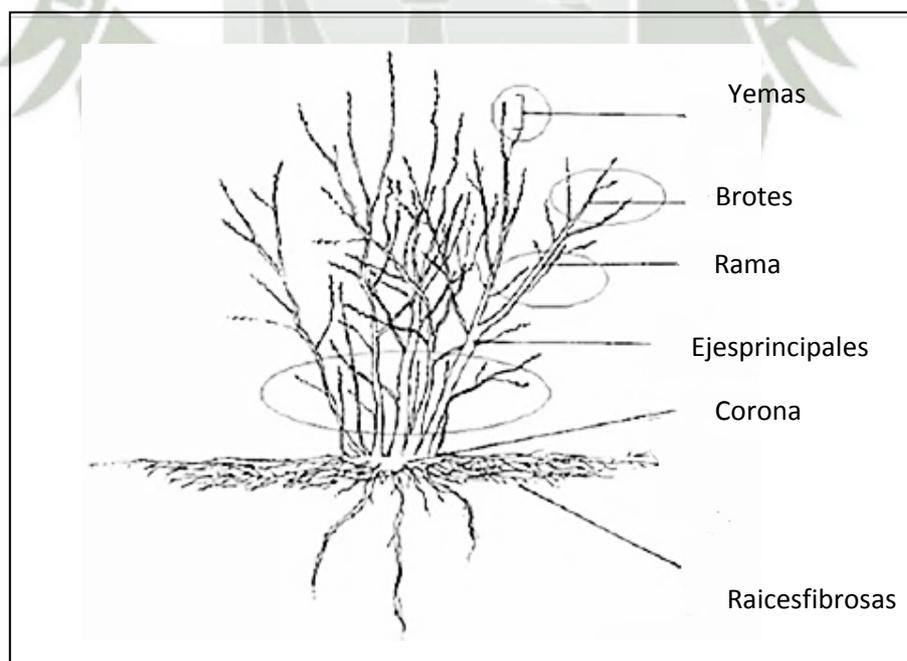


Figura N° 2: Partes de una planta de arándano

Obtenido de: Peruberries, 2012

El arándano es una fruta baja en calorías y sodio fuente de fibra y pectina destacándose su alta concentración de Vitamina C. Este fruto se consume tanto fresco como procesado. El arándano no solo se destaca como fruto comestible sino también en medicina (antioxidante, basculo – protector, antiséptico urinario), industria de colorantes, pastelería, mermeladas, conservas, yogures, golosinas, etc. Además al no ser tan perecibles facilitan los traslados prolongados via marítima (Gámez Bastén, 2002)

Las variedades cultivadas en el Perú son (Sierra exportadora, 2011):

- Biloxi: Planta con tallos erectos, vigorosos, productivos. La fruta madura tempranamente, tamaño de baya mediano, buen color, firmeza y sabor. Es un cultivar que requiere pocas horas de frío. Tiende a florecer y fructificar 2 veces al año, siendo en algunos casos la segunda fructificación no deseada.
- Misty: variedad liberada por la Universidad de Florida en 1992. No ha sido patentada y puede ser propagada sin restricciones. La calidad del fruto es excelente. Las plantas tienden a producir demasiadas yemas florales produciendo una sobreabundancia de frutos y pocas hojas en primavera. Sus requerimientos de frío son de 150 – 200 horas de frío y es fácil de enraizar.
- Legacy: variedad tolerante a altas temperaturas y sequía. Tallos vigorosos, erectos y productivos. Fruta de tamaño medio, con un buen sabor y dulzura. Sus frutos son de color azul claro, muy firmes, de gran sabor y con una cicatriz muy pequeña, lo que permite su larga vida post-cosecha, superior a 9 semanas en condiciones de atmósfera controlada.
- O'neal: Variedad de crecimiento moderado con tallos erectos y vigorosos. Fruto muy grande y de excelente sabor. Su requerimiento de horas de frío son de 200 – 300 horas de frío.
- Duke: Esta es una variedad muy productiva, es el cultivar de arándano más plantado a nivel mundial. Es de producción temprana y su fruto es de

excelente calidad. La principal desventaja de Duke es que puede ser un desafío mantener el vigor del arbusto con el paso del tiempo. Es una de las variedades que mejor se adapta a la cosecha mecánica. Su fruta es de tamaño medio, azul claro, firme, cicatriz pequeña, sabor débil, que llega a ser más aromático después de almacenaje.



Figura N° 3: *Frutos de arándano Misty.*

Obtenido de: Berries del Sol

2.1.3 Cultivo del arándano

a) Propagación por esquejes.

La propagación por esquejes es una forma de propagación asexual en la cual se utiliza esquejes semileñosos sin hojas. Como sustrato para el enraizamiento se emplea turba mezclada con perlita en proporción 4:1 (v/v), de esta manera se le da al sustrato condiciones químicas y físicas adecuadas para la promoción de raíces adventicias. La aplicación de hormonas enraizantes facilita la formación de raíces, para ello se utiliza el ácido indol acético (AIA), ácido naftalen acético (ANA) o ácido indol butírico (AIB) en concentraciones de 1000 a 4000 ppm. Una vez finalizado el período de enraizamiento los esquejes enraizados se trasplantan a bolsas de aproximadamente 20 por 25 cm. para su viverización (Rodríguez, 2012).



Figura N° 4: *Enraizamiento de esquejes de arándano en perlita y turba.*

Obtenida de: Blueberries Chile

b) Requerimientos edafoclimáticos (García & Rubio, 2005)

El arándano de arbusto alto puede llegar a soportar temperaturas muy bajas durante el invierno ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$), no presentando grandes riesgos frente a heladas, por otro lado, temperaturas altas, superiores a $28-30^{\circ}\text{C}$, pueden afectar negativamente al fruto al ocasionar arrugamientos y quemaduras. Los vientos fuertes, sobre todo en los primeros años de vida de la planta, perjudican el crecimiento de ésta, provocando daños en el follaje, afectando a la floración y a la polinización por insectos. También ocasiona la caída de frutos y lesiones en éstos.

En cuanto a los suelos, estos deben ser de textura ligera, buen drenaje y abundante materia orgánica, superior al 3%, que permite mantener la retención de humedad necesaria para el óptimo desarrollo del sistema radical, el pH del suelo es limitante para su cultivo, exigiendo valores ácidos, inferiores a 5.5, situándose el intervalo óptimo entre 4.5 y 5.5.

c) Requerimientos nutricionales

Los arándanos son nativos de áreas arenosas o pantanosas, con capas freáticas en que los nutrientes son bajos. Los estudios nutricionales en el cultivo han demostrado un bajo requerimiento de aplicaciones de nutrientes, sin embargo responden a las aplicaciones de estos siempre que sean en cantidades adecuadas. Es frecuente la muerte de plantas debido a la sobre fertilización.

Las plantas de arándanos crecen en condiciones de suelo ácido, lo que permite lograr una alta disponibilidad de algunos nutrientes como el hierro y manganeso, cuyos requerimientos en la planta de arándano son superiores a los de otras especies frutales (Hirzel & Rodriguez, 2003).

Strik y Hart (1997), sostienen que el nitrógeno es el nutriente más importante en el cultivo de arándanos. En niveles adecuados en los tejidos es responsable del crecimiento de los nuevos brotes y el desarrollo de yemas florales.

d) **Plagas y enfermedades**(Garcia & Gonzales, 2011)

Plagas

Todas las plagas del arándano causadas por insectos producen síntomas y daños característicos que son fácilmente identificables en el campo.

- **Cochinillas** (*Aspidiotus* sp., *Pulvinaria* sp., *Lepidosaphesulmi* L.), tienen una escasa movilidad sobre el cultivo, sólo algunos estadios juveniles poseen patas y se trasladan hacia otras partes de las plantas donde se establecen formando nuevas colonias. Los adultos poseen un caparazón de protección llamado escudo. Cuando aumenta la temperatura se debe tratar de localizar los estadios juveniles para detectar los primeros nacimientos y realizar el control adecuado.
- **Cheimatobia** (*Cheimatobia brumata* L.), ataca a flores y a frutos, esta oruga alcanza 3 cm. de largo, es de color verde, con una banda dorsal más oscura y dos laterales blancas y como es característico en este género, camina encorvando su abdomen en forma de asa. Suele alimentarse de yemas, para pasar a flores y frutos más tarde.
- **Pulgones o áfidos** (*Myzuspersicae sulzer*, *Aphisgossypii glover*, *Aphispiraecola patch.*), al ser insectos chupadores extraen nutrientes de la planta y alteran el balance de las hormonas del crecimiento. Esto origina un debilitamiento de la planta, que puede traducirse en una reducción de la producción final.
- **Los pájaros** constituyen la plaga de vertebrados más seria de los arándanos, sobre todo en parcelas pequeñas o en aquellas situadas en zonas donde abunden grandes

bandadas. Se controlan por métodos ahuyentadores o también cubriendo la parcela con una red antipájaros, aunque esta solución puede resultar antieconómica. Actualmente se están probando repelentes, algunos productos de origen vegetal como el antranilato metílico, un compuesto que se encuentra en las uvas y en algunos cítricos.

- **Nemátodos.** Existen algunas especies pertenecientes a los géneros, *aratrighodorus* sp. y *Hemicycliophora* sp., que producen daños en viveros. *Xiphinemasp.* es un vector de virus. Sin embargo, el arándano es resistente a dos parásitos muy dañinos en diferentes cultivos, como son *Meloidogynehapla* y *Pratylenchuspenetrans*.

Enfermedades

- **Enfermedades producidas por hongos**

- **Antracnosis** (*Colletotrichum* sp.). El hongo puede afectar a ramas, hojas y flores, pero los daños más graves los provoca en los frutos. En este caso, se requiere un análisis y tratamiento particular de la enfermedad, ya que los frutos pueden ser asintomáticos en la planta y producir grandes pérdidas en post-cosecha. La infección tiene lugar durante la floración, manifestándose el daño en el momento de la recolección. Se reconoce por un hundimiento sobre el fruto y la formación de esporas color salmón sobre éste. Los cultivares “rabbiteye” son, en general, menos susceptibles que los “highbush”.
- **Botritis o Podredumbre gris** (*Botrytis cinerea*). La mayor incidencia de esta enfermedad coincide con primaveras muy lluviosas y temperaturas en torno a los 20°C. Los síntomas se manifiestan con el marchitamiento de las terminaciones de los brotes jóvenes, que al principio toman un color marrón o negro, para blanquear más tarde a tostado o gris, pudiendo alcanzar toda la rama. Las flores marchitas permanecen en la planta mucho más tiempo que las no afectadas. Las partes viejas de la planta raramente son atacadas, aunque en ellas el hongo puede vivir como saprófito durante el invierno, propagándose en primavera en forma de esporas que afectan principalmente a

los racimos florales e incluso a los frutos, presentando un aspecto momificado.

- **Monilia**(*Monilia*sp.). Es una de las enfermedades más comunes en el arándano, tanto en los grupos “highbush” como “rabbiteye”. Este hongo afecta a brotes, hojas, flores y frutos, pudiendo llegar a reducir considerablemente la cosecha. Las ramas y flores afectadas se marchitan y se vuelven de un color marrón, como si estuvieran quemadas. Las hojas y brotes desarrollados en la primavera se caen. En los frutos no se aprecia el daño hasta casi la madurez, adquiriendo un color crema o rosa salmón, y volviéndose eventualmente rojizos o marrón claro.
- **Phomopsis**(*Phomopsisvaccinii*). Esta enfermedad fue una de las primeras observadas en las plantaciones americanas, y ha ido adquiriendo importancia económica, ya que puede llegar a matar por completo a plantas jóvenes. El hongo penetra en las yemas florales y en el tallo. Los síntomas comienzan a notarse en brotes jóvenes de primavera, secándose el extremo apical que queda doblado en forma característica de bastón. Los daños severos en plantaciones adultas se observan durante el verano, cuando es común ver plantas con parte de las ramas principales totalmente secas y el resto sanas. Los frutos dañados son blandos, a menudo se agrietan y pierden jugo.
- **Enfermedades producidas por bacterias**
 - **Bacteriosis.** *Agrobacteriumtumefaciens* es la bacteria que principalmente afecta a este cultivo. Ataca al sistema radical debilitando la planta y produciendo, incluso, su muerte. En la base de las cañas, o en las raíces principales de plantas afectadas, pueden apreciarse unas agallas o tumores. Éstas, cuando son jóvenes, son de color crema o marrón claro, y a medida que crecen adquieren un color marrón oscuro o negro, volviéndose ásperas, duras y de tamaño variable.

- **Enfermedades producidas por virus**

- **Virosis y micoplasmosis.** En cuanto a los virus que pueden afectar al arándano, uno de los más importantes es la mancha anularo *Red ringspot*. Esta enfermedad a menudo aparece sobre tallos, pero los síntomas más aparentes se aprecian en agosto o en septiembre en las hojas, especialmente de la mitad basal de los tallos. Estas hojas viejas muestran, en su haz, manchas anulares rojizas pero verdes en su zona central. Es necesario realizar el test correspondiente (ELISA) para la detección de este virus.

2.1.4 Distribución y Producción Mundial.

El arándano es un frutal ampliamente distribuido por el Hemisferio Norte, básicamente por Norteamérica, Europa Central y Asia, encontrándose también en América del Sur, y unas pocas especies en África y Madagascar.

De las 30 especies que constituyen el género *Vaccinium*, sólo un pequeño grupo de ellas tienen importancia comercial. Destacan *V. corimbosum* L., que representa aproximadamente el 80% del total de la superficie cultivada, seguido en importancia por *V. ashei* Reade, con un 15% aproximadamente. Entre el 5% restante destacan *V. angustifolium* Aiton y algunos híbridos de *V. angustifolium* x *V. corymbosum*. (García y Gonzales, 2011).

Los arándanos representan una de las especies de más reciente domesticación, ya que los primeros programas de selección de arbustos y de técnicas de propagación se iniciaron en Norteamérica a finales del siglo XIX, comienzos del siglo XX. Todos los cultivares obtenidos hasta la actualidad se han desarrollado a partir de formas silvestres.

La producción mundial se concentra básicamente en Norteamérica, sin embargo se observa que la producción tanto en los países productores-consumidores tradicionales como los abastecedores en contra estación (hemisferio sur) se han incrementado, siendo Sudamérica la que más ha crecido durante la última década. Los principales países productores son Estados Unidos, Canadá, juntos tienen el 90% del área productiva total, seguido por Chile, Polonia, Alemania, España, Argentina, tal como se observa en la tabla N°1.

Tabla N° 1:

Producción mundial en 2003 de arándanos “highbush” y “rabbiteye”.

ZONA DE PRODUCCIÓN	SUPERFICIE PLANTADA (ha)	PRODUCCION (t)		
		FRESCO	INDUSTRIA	TOTAL
Norteamérica	27.105	61.135	42.360	103.495
Europa	3.490	10.370	950	11.320
Sudamérica	3.825	10.320	400	10.720
Oceanía ¹	910	1.950	950	2.900
Asia	550	415	600	1.015
Sudáfrica	350	200	100	300
Total mundial	36.230	84.390	45.360	129.750

Fuente: Strik, *Crónica Horticulturae*, 2005. 45 (1), 7-12)

Chile es el mayor productor de arándanos en América del Sur. Con una superficie estimada de 6.800 hectáreas (2007), es el mayor exportador hacia el hemisferio norte. La introducción de las primeras plantas se inició en la década de los ochenta, a finales de la misma, la producción ya se había comenzado en la parte sur del país. Hoy en día, se produce arándanos desde Copiapó, en el norte, hasta Puerto Montt en el sur. Lo cual es hecho estratégicamente para poder mantener la producción de arándanos desde octubre hasta finales de marzo. Hoy en día, el área principal de producción es la Región del Biobío. La producción ha evolucionado rápidamente en la última década. En términos de valor, la exportación de arándanos se ha convertido en la cuarta fruta más importante de Chile. La gran mayoría de la producción de arándanos frescos se exporta principalmente a América del Norte (80%), seguido por Europa (18%). En el 2007, Chile exportó más de 21000 toneladas de arándanos frescos y más de 1000 toneladas de producto congelado. La mayor parte de la producción proviene del tipo de arándanos “Highbush,” pero también se producen otras variedades, se estima que existen más de 800 productores de arándanos, con una producción de 50 a 200 hectáreas (USDA, 2011).

En Perú hoy sólo existen unas 200 ha sembradas, la mayoría de ellas ubicadas en zonas de Costa. En el futuro próximo se asoman distintos proyectos que sumarían otras 700 ha aproximadamente. Se ha identificado que las variedades de Arándano

que mejor se adaptan a las condiciones peruanas son: Biloxi, Misty, O'Neal y Legacy (Perú Berries, 2012).

Tabla N° 2:

Área cultivada de Arándanos en Perú

Productor	Localidad	Superficie (en Hectáreas)
Frutícola La Lozada	Arequipa	Sin información
Frutícola la Joyita	Arequipa	14 ha
Blueberries Perú	Cañete	Vivero
Inca Berries	Lima	Sin Información
Arándanos Perú	Huaral	Vivero
Iberagro	Ancash	Sin Información
Agrícola Athos	Caraz	10 ha
Camposol	La Libertad	50 ha
Talsa	La Libertad	50 ha
Valle y Pampa	Pisco	6 ha
Pichupampa	Sierra de Lima	1 ha
Frutícola Paiján	Trujillo	Sin Información
Antonio Tipismana	Mala	4 ha
José Luis Dibos	Mala	4 ha
IntipaFoods	Caraz	30 ha
Arequipa Berries	Arequipa	2 ha
In Vitro Berries	Trujillo	Vivero
Berries Cajamarca	Cajamarca	4 ha
Finca Tradiciones	Cajamarca	22 ha

2.1.5 Mercado para el Arándano

El arándano es una fruta muy apreciada y consumida tradicionalmente por los países del hemisferio norte, principalmente Estados Unidos y Canadá, en algunos países europeos, tales como los países bajos, Francia, Italia, Inglaterra y Holanda. Sin embargo Estados Unidos es el principal productor, consumidor, exportador e importador de arándanos del mundo. Estados Unidos es un mercado maduro, donde se consume el arándano en todas sus modalidades desde el fresco hasta el procesado

y se está sustituyendo el consumo de otras frutas a medida que el arándano está disponible todo el año en los supermercados, y los hábitos de consumo cambian de estivales a anuales. Europa está en crecimiento, y va rumbo a convertirse en un mercado similar en volumen al norteamericano. Siguiendo los cambios de hábitos hacia el consumo de frutas y hortalizas y la vinculación de esta fruta con lo silvestre. Asia, es un mercado incipiente; en Japón lo han incorporado dadas las acciones de marketing que la USHBC (UnitedStates Highbush Blueberry Council) está haciendo. En Corea del Sur, Malasia, Taiwán, Singapur y la ciudad de Shanghái, recién comenzaron las acciones de penetración del mercado. El Perú se encuentra en estados tempranos de desarrollo en el cultivo de arándanos (Benavides, 2011).

2.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES “IN VITRO”

2.2.1 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales significa cultivar parte de una planta dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial con condiciones físicas y químicas adecuadas. Esta forma de propagar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia, y el control de los factores que afectan el crecimiento (Roca y Mroginski, 1991).

En los últimos años el desarrollo de la técnica de propagación *in vitro* de tejidos vegetales ha tenido un gran impulso, debido a la producción de material vegetal libre de virus, de mayor vigor y homogeneidad genética, lo que ha permitido no solo incrementar la productividad de numerosos cultivos hortícolas, frutales, forestales y ornamentales de alto valor comercial. En el área científica el cultivo de tejidos ha iniciado una nueva era en la genética moderna (Hurtado, 1994).

2.2.2 Micropropagación

La micropropagación es una técnica aplicada para la rápida multiplicación de plantas. Esta técnica posee un gran potencial comercial debido a la velocidad de propagación, la alta calidad de plantas que se obtienen y la posibilidad de producir plantas libres de patógenos. El uso de esta tecnología también se enfoca a otras aplicaciones tales como la producción de doble haploides, criopresevación,

propagación de nuevas variedades de plantas o en peligro de extinción, propagación de plantas difíciles de multiplicar, producción de metabolitos secundarios y generación de plantas transgénicas.

La principal ventaja de este sistema de propagación es la producción de material vegetal de alta calidad y uniformidad en corto tiempo y bajo condiciones de cultivo libre de enfermedades (Steward, 1970). Por otra parte, la técnica de micropropagación es más costosa que los métodos tradicionales de producción de plantas y el uso de reactores posibilita la producción masiva de plantas bajando los costos de producción (FAO/IAEA, 2004).

a) Cultivo de Segmentos Nodales

Al realizar este tipo de cultivo se aísla una yema junto con una porción de tallo, para que posteriormente la acción de las citocininas, frene la dominancia apical e induzca la formación de yemas axilares. Cuando se produce un número suficiente de yemas, se procede al enraizamiento, y las plántulas obtenidas son trasladadas al suelo (Pierik, 1990).

b) Fases de la Micro propagación

- **Fase I. Preparación de la planta madre:** Para el establecimiento del cultivo *in vitro* en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. En esta fase se mantiene a las plantas madre por un periodo de tiempo en un invernadero, en el que se controla las condiciones sanitarias y la nutrición (Rosell y Villalobos, 1990).
- **Fase II. Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia:** Una vez seleccionada la planta madre, se extraen los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Antes de ser introducidos en el medio de cultivo lo explantes deben ser desinfectados para eliminar los contaminantes externos. Luego de la desinfección de los explantes, se debe mantener las condiciones de asepsia y realizar la establecimiento *in vitro* en una cámara de flujo laminar. (Rosell y Villalobos, 1990).

- **Fase III. Multiplicación:** Durante esta fase se espera que los explantes originen brotes de procedencia axilar o adventicia con varios entrenudos. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio de cultivo.
- **Fase IV. Enraizamiento:** El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, disminuir las citocininas y aumentar las auxinas exógenas (Villalobos y Thorpe, 1993).
- **Fase V. Aclimatación:** Cuando el sistema radical es diferenciado *in vitro*, las plantas no se pueden trasplantar directamente a las condiciones de invernadero sin pasar por un periodo de aclimatación o endurecimiento. En este periodo las plantas son trasplantadas a recipientes con suelo estéril y se cubren con bolsas de polietileno, que se van perforando gradualmente hasta que queden eliminadas completamente en un periodo de 15 a 20 días. Durante la fase de endurecimiento las plantas se riegan preferentemente con medio de cultivo diluido al 50% (Villalobos y Thorpe, 1993).

2.2.3 Medio de cultivo

Se han descrito numerosas formulaciones adaptadas para casos concretos, no existiendo un medio único ideal. Las necesidades nutritivas para un crecimiento óptimo *in vitro* varía con la especie y pueden ser específicos de acuerdo a la parte de la planta o tipo de tejido que se cultiva y a la respuesta que se desea obtener (Sabit, 2006). Sin embargo el medio de cultivo más utilizado es el descrito por Murashige y Skoog (MS), además se han descrito modificaciones adaptadas para plantas leñosas como los descritos por Quoirin y Lepoivre (1977) y el “Woody plant médium” por Lloyd y McCown en 1980.

El éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc.

a) Componentes de los medios de cultivo (Agrovit, 2002)

• Macronutrientes

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

- **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.
- **Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).** Satisface tanto el requerimiento de magnesio como el de azufre.
- **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.
- **Potasio.** Puede adicionarse en grandes cantidades en la naturaleza, es un catión que se agrega en forma de KCl , KNO_3 ó KH_2PO_4 .
- **Calcio.** Se adiciona como $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ o la forma anhidra de cualquier sal.
- **Sodio.** Este catión no es requerido por plantas superiores, sin embargo, puede ser un elemento esencial para cultivo de halófilas.
- **Cloro.** Está presente en la forma de KCl ó $CaCl_2$.

• Micronutrientes

- **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.

- **Manganeso.** Es necesario para el mantenimiento de la ultra estructura y el proceso fotosintético.
- **Cobre y Zinc.** Son requeridos para la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos.
- **Molibdeno.** El molibdeno, junto al hierro, forman parte de las enzimas nitrato reductasa y nitrogenasa.
- **Cobalto.** Es el metal componente de la vitamina B12.
- **Boro.** Es necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática. Está involucrado en la síntesis de bases nitrogenadas, en particular uracilo.
- **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:

 - **Tiamina (vitamina B1).** Se añade como tiamina-HCl. Esta es la única vitamina vital para el crecimiento de las células vegetales.
 - **Piridoxina (vitamina B6).** Se añade como Piridoxina-HCl.
 - **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.
 - **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.
 - **Vitamina E.** Ayuda a la formación de callos que provienen de embriones y en cultivos en suspensión ayuda a la viabilidad de células.

- **Reguladores de Crecimiento**

El crecimiento de las plantas es un proceso dinámico, complejo y que está rigurosamente controlado, en el que los reguladores de crecimiento vegetal juegan un papel importante en el control de crecimiento. Presentan un área y un espectro de acción muy diverso, pues además pueden influir en múltiples procesos, totalmente distintos al mismo tiempo y en partes diferentes de la planta. Actualmente se reconocen cinco tipos básicos de reguladores de crecimiento vegetal como son las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. De los cinco sistemas químicos incluidos en este grupo, las auxinas y las giberelinas estimulan principalmente la elongación celular; las citocininas estimulan la división celular. Mientras que cada una es diferente a las demás en sus características químicas y en su capacidad de inducir respuestas de crecimiento, cada una de los cinco tipos de reguladores es capaz de influir en muchos aspectos del crecimiento, de la diferenciación y en diversos fenómenos del desarrollo de las plantas, promoviéndolos o inhibiéndolos (Hurtado, 1994).

- **Auxinas**

Las auxinas son sustancias reguladoras de crecimiento producidas en las plantas superiores y que se encargan de promover el crecimiento. De forma natural, las concentraciones más altas de auxina se encuentran en los ápices de crecimiento (ápices del coleóptilo, yemas y ápices del crecimiento de hojas); sin embargo, también se encuentran auxinas ampliamente distribuidas por la planta, provenientes de las regiones meristemáticas. La translocación de la auxina desde sus puntos principales de síntesis, que son los meristemos apicales, básicamente es hacia abajo; esta polaridad del transporte se mantiene aún si el tejido vegetal es cortado y mantenido hacia abajo, existiendo, por tanto, un ápice fisiológico interior sin importar la orientación que estos tengan.

La conducción de la auxina en los tejidos vegetales tiene lugar a velocidades suficientemente altas como para que el proceso de difusión sea su principal método de transporte; así mismo, las auxinas pueden circular en contra de un gradiente de concentración lo que depende de la energía metabólica (Hurtado, 1994) (Taiz

&Zeiger, 2006). Las auxinas participan ampliamente en la organización de los procesos vegetales, incluyendo la regulación de las proporciones del crecimiento diferencial y la regulación de fenómenos de diferenciación, los cuales son estimulados o inhibidos según la concentración auxínica presente en la célula o en la estructura vegetal, los principales efectos de las auxinas son el alargamiento y la división celular, la formación de brotes, raíces y tejido calloso, la respiración, abscisión, partenocarpia, dominancia apical, embriogénesis, etc. Además son un factor esencial en el crecimiento de las raíces.

La forma mas común de auxina natural es el ácido indol-3-acético (IAA). La regulación del crecimiento vegetal puede depender en parte de la cantidad de auxina libre presente en las células, tejidos y órganos. Hay dos fuentes principales de auxina en las células: el citosol y los cloroplastos. Los niveles de auxina libre pueden ser modulados por factores, que incluyen la síntesis e hidrólisis del IAA conjugado, el metabolismo del IAA y el transporte polar de la auxina. Se han identificado varias rutas en la biosíntesis del IAA, unas rutas son dependientes del triptófano y otras independientes de este aminoácido. También se han identificado varias rutas degradativas del IAA (Taiz & Zeiger, 2006).

Las auxinas empleadas frecuentemente son: AIB (ácido indolbutírico), AIA (ácido indol acético), ANA (ácido naftalenacético), que se utilizan en un rango de 0.1 a 10 mg/L

ç, el 2,4-D y el PCA (ácido paraclorofenoxiacético), que se utilizan en un rango de 0.001 a 4 mg /L (CIAT, 1991).

- **Citocininas**

Son las sustancias que pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis, casi todas las citocininas conocidas, tanto naturales como sintéticas, son derivadas de la adenina. Además, aunque son bastante diferentes de la adenina, las fenil-ureas también presentan actividad citocinínica.

La zeatina extraída del endospermo de maíz es la citocinina más potente que está presente tanto en plantas superiores como inferiores. Actualmente existen citocininas

sintéticas de tipo purínico, estas citocininas son más activas.

Existe evidencia de que las citocininas se concentran en tejidos con crecimiento activo, ya que los niveles citocinínicos son muy altos en frutos jóvenes, en semillas, embriones, hojas, predominantemente, en las raíces, que parecen ser la fuente principal de citocininas de las plantas, desde las cuales son enviadas hacia los brotes. El papel de las citocininas en el desarrollo de las raíces es extremadamente limitado.

Las citocininas son aminopurinas que inician la proliferación celular en muchas células vegetales cuando son cultivadas en un medio que contiene una auxina. La principal citocinina de las plantas superiores, la zeatina trans-6-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enilamino) purina, está presente como ribósido y glucósido.

Las citocininas son sintetizadas en raíces, en embriones en desarrollo, en hojas jóvenes, en frutos y en los tejidos tumorales de corona. Las citocininas se concentran en las células jóvenes que se dividen rápidamente, en los meristemos apicales de los tallos y las raíces. Son transportadas pasivamente desde la raíz al tallo, a través del xilema, junto con el agua y los minerales. Las citocininas participan en la regulación de muchos procesos en las células como la división celular, la morfogénesis de tallos y raíces, la maduración de los cloroplastos, la elongación celular y la senescencia.

Las más utilizadas son BAP (bencilaminopurina), la cinetina y zeatina, utilizadas en concentraciones de 0.03 a 30 mg/L y el 2-iP (2-isopentenilaminopurina) que se utiliza en un rango de 5.0 a 20 mg/L (Cutz Tax, 2004) (Konar, 1973).

- **La relación auxina/citocinina regula la morfogénesis en cultivos de tejidos.**

Alterando ligeramente las concentraciones relativas de auxina y citocinina, los investigadores han podido modificar el desarrollo de las células indiferenciadas de los cultivos de tejidos. Una concentración más o menos igual de las dos hormonas, hace que las células sigan indiferenciadas, formando masas de tejido llamadas callos. Cuando la concentración de auxina es superior, el tejido indiferenciado organiza raíces. Con una concentración superior de citocinina, se forman yemas. Con un cuidadoso equilibrio de las dos hormonas se puede producir raíces y yemas, y por lo tanto, una planta incipiente.

- Las giberelinas

El ácido giberélico (AG), tras su aislamiento a partir del hongo *Gibberella fujikuroi*, ha sido ampliamente estudiado por sus funciones en el alargamiento celular. (Cutz Tax, 2004). De este grupo se conocen más de 100 miembros que comparten el anillo gibano y se denominan cada una con un número según el número de carbonos presentes en su estructura. Ninguna planta tiene todas las giberelinas, algunas han sido encontradas únicamente en hongos. Así también, no todas las giberelinas son igualmente activas, algunas son precursoras de otras giberelinas. El AG₁ es la giberelina más activa en cuanto a promover la elongación celular. Sin embargo muy pocas giberelinas están disponibles comercialmente, por lo que una de las más comerciales es el AG₃ (Konar, 1973).

Las giberelinas participan en varias funciones del desarrollo vegetal, además de la elongación celular, participan en la activación de enzimas hidrolíticas como la α -amilasa y la proteasa en semillas y cereales, por lo cual facilita la movilización del endosperma. En algunas plantas promueve la germinación de semillas, la floración, así como determina el sexo y el desarrollo de los frutos. Las giberelinas no son esenciales para inducir el crecimiento y diferenciación de los tejidos vegetales, pero aún así se las utiliza para la elongación de tallos y hojas ya que estimulan la elongación celular. Sin embargo, cuando se añade AG₃ al medio, este puede tener un comportamiento de auxina. Altas concentraciones de AG₃ induce la formación de callo (Schroeder & Spector, 1957).

Los efectos en el cultivo de tejidos pueden ser diversos, por ejemplo algunas veces pueden disminuir o prevenir la formación de raíces o brotes adventicios, cuando se utilizan en combinación con auxinas y citocininas, mientras que en algunas plantas el AG₃ solo, induce la formación de brotes adventicios, ya que puede actuar como un reemplazo de la auxina (Konar, 1973).

- Etileno

El etileno se forma en la mayoría de órganos de las plantas superiores. Los tejidos senescentes y los frutos en maduración producen más etileno que los tejidos

jovenes. El precursor del etileno *in vivo* es el aminoácido metionina que es convertido a SAM (S-adenosilmetionina), ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) y etileno. La biosíntesis del etileno es inducida por numerosos procesos del desarrollo, por las auxinas y por los estreses ambientales. Los efectos fisiológicos del etileno se pueden bloquear por inhibidores biosintéticos o por antagonistas. El AVG (aminoetoxivinilglina) y el AOA (ácido aminooxiacético) inhiben la síntesis del etileno.

El etileno regula la maduración de frutos y otros procesos asociados a la senescencia de hojas y flores, la abscisión de la hoja y del fruto, el crecimiento de plántulas y la apertura del gancho apical. El etileno también regula la expresión de numerosos genes, como los relacionados con la maduración y la patogénesis (Taiz & Zeiger, 2006).

- **Ácido Abscísico**

El ácido abscísico tiene una función principal en la dormición de semillas y yemas, así como en respuesta al estrés hídrico. El ABA es un compuesto terpenoide de 15 carbonos, derivado de la porción terminal de los carotenoides. El ABA se produce por la ruptura de un precursor carotenoides de 40 carbonos que se sintetiza a partir del isopentenil difosfato a través de la ruta terpenoide. El ABA se inactiva por degradación oxidativa y por conjugación.

El ABA se sintetiza en casi todas las células que contienen plastos y es transportado tanto por el xilema como por el floema. El nivel de ABA varía drásticamente en respuesta a cambios en el desarrollo y ambientales. Durante la maduración de las semillas, los niveles de ABA tienen un máximo a mitad y final de la embriogénesis. El ABA es necesario para el desarrollo de la tolerancia a la desecación en el embrión en desarrollo, la síntesis de proteínas de reserva y la adquisición de la dormición. El ABA es antagonista del etileno y de los brasinosteroides en la promoción de la germinación.

- 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, endospermo de coco, etc. 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 (Vuylsteke, 1989).

2.2.4 Métodos de esterilización (Clavell & Pedrique, 1992)

a) Agentes físicos

El calor se puede aplicar como agente esterilizante de dos formas: el calor húmedo, el cual destruye a los microorganismos por desnaturalización de las proteínas y el calor seco que destruye a los microorganismos por oxidación de sus componentes celulares. El material a esterilizar debe soportar altas temperaturas sin sufrir ningún tipo de daño.

La radiación, puede ser utilizada como agente para la eliminación de microorganismos. Así tenemos que las radiaciones ionizantes se pueden utilizar para esterilizar materiales termolábiles, como por ejemplo plásticos, y las radiaciones no ionizantes, como la luz ultravioleta, puede ser empleada en el control de áreas cerradas.

b) Agentes mecánicos

La filtración permite la remoción de todos los microorganismos presentes en un líquido o un gas reteniéndolos sobre la superficie de un material.

c) Agentes químicos

Algunas sustancias químicas pueden ser usada como agentes esterilizantes ya que tienen la capacidad de promover una o más reacciones capaces de dañar los componentes celulares de los microorganismos.

2.2.5 Condiciones ambientales para la incubación

Las condiciones del ambiente influyen en varios aspectos sobre el desarrollo de las plantas *in vitro*. En tejidos vegetales el explante se incuba en ambientes controlados (luz y temperatura), ya que las respuestas morfogenéticas pueden ser alteradas por la temperatura, así como por la calidad, intensidad y duración de la luz (Usui K.et Al., 1996).

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. Normalmente lo mejor es una iluminación entre 1000 a 3000 lux, según la especie de la planta, para lo cual se utilizan lámparas fluorescentes. Comúnmente se utiliza un fotoperiodo 16 horas luz por ocho horas de oscuridad. Una humedad relativa entre 70 a 80% es adecuada (Usui K.et Al., 1996).

2.2.6 Problemas en el cultivo *in vitro*

Cada uno de los pasos necesarios en el proceso de micropropagación tiene problemas específicos, aunque algunos de ellos pueden implicar dos o más estadios (Debergh y Read, 1991). Los principales problemas en el cultivo *in vitro* son la contaminación de los explantes, la oxidación fenólica, la hiperhidricidad y la variación somaclonal.

- **Contaminación**

Las contaminaciones pueden causar pérdidas económicas muy importantes en la micropropagación. La contaminación más que matar a los explantes directamente invade el cultivo haciendo que el explante no sea apto para su micropropagación (Cassells, 1991).

La mayor parte de los contaminantes, en el cultivo de tejidos, proceden de la planta donadora. Al establecer los cultivos y dependiendo del explante que utilicemos, se pueden transmitir microorganismos de la superficie del explante o de su interior. Con el cultivo de meristemos y dependiendo del tamaño del mismo, se pueden eliminar la mayoría de los organismos, sin embargo, en el caso de hojas, peciolo y tallos casi todos los microorganismos en el tejido pueden transmitirse. Por lo tanto, es conveniente analizar las plantas de las que proceden los explantes en búsqueda de individuos limpios y rechazando aquellos que están contaminados fuertemente. La búsqueda de contaminaciones debe incluir análisis de los organismos que pueden crecer en el medio de cultivo y por otra parte los patógenos que infectan de forma específica al cultivo. Los principales microorganismos asociados a las superficies de las plantas son hongos, levaduras, bacteria y molicutes (fitoplasmas, espiroplasma y organismos relacionados). Muchos de estos microorganismos se pueden eliminar mediante esterilizaciones superficiales. Los microorganismos endófitos que se pueden desarrollar en las plantas pueden ser virus, viroides, bacterias, micoplasmas y hongos y pueden afectar de forma inter o intracelular. Los microorganismos intercelulares son generalmente transmitidos mediante vectores o mediante el contacto entre plantas sanas e infectadas. Los microorganismos endógenos tanto intercelulares como intracelulares no se pueden eliminar mediante esterilizaciones y pueden desarrollarse en el medio de cultivo de las plantas aunque el crecimiento de algunos puede ser inhibido mediante altas concentraciones de sal o azúcar y el pH. Algunos de estos microorganismos se expresan con rapidez y son fáciles de detectar mediante inspecciones rutinarias pero otros permanecen latentes hasta que las condiciones sean favorables como la transferencia de los explantes a un medio nuevo especialmente cuando se reduce la concentración de sales y de azúcar en el medio.

Se puede detectar la presencia de organismos cultivables mediante uso de medios específicos para hongos y bacterias.

- **Oxidación fenólica**

La producción de compuestos fenólicos se estimula cuando las plantas se exponen a situaciones de estrés como pueden ser los daños mecánicos que se producen al aislar los explantes de la planta madre. Las reacciones de hipersensibilidad incluyen la liberación del contenido de las células rotas, reacciones en las células vecinas sin mostrar síntomas de lesiones y/o la muerte primitiva de células específicas en el entorno de la zona de la herida o la zona de infección (Debergh y Read, 1991). Las superficies de corte de muchos explantes comienzan a decolorarse justo después de cortarlas. Los explantes completos o partes de ellos frecuentemente continúan oscureciéndose cuando se introducen en el recipiente de cultivo y exudan sustancias que producen a su vez el oscurecimiento del medio. No todos los compuestos que se producen son inhibidores, pero frecuentemente se encuentra que, una vez se produce la decoloración, el crecimiento se inhibe y los tejidos se mueren a no ser que se tomen medidas oportunas (George, 1996).

El ennegrecimiento de los tejidos y los daños que esto implica es mucho más severo en las primeras etapas del cultivo y deja de ser un problema una vez los explantes comienzan a crecer. Una vez establecido el cultivo, la consecuencia de la secreción de sustancias fenólicas suele ser una inhibición del crecimiento pero, en este caso, ya no es letal. La extensión del ennegrecimiento y la inhibición del crecimiento dependen mucho del genotipo. Es especialmente problemático en especies que contienen niveles altos de taninos y otros hidroxifenoles. Se encuentran también diferencias entre especies dentro del mismo género y entre cultivares dentro de las especies. El genotipo influye en la cantidad de sustancias fenólicas producidas así como en su toxicidad. Los tejidos jóvenes tienen generalmente menos tendencia a producir compuestos fenólicos que los más viejos. Existen casos en los que los explantes son sensibles a la presencia de auxinas en el medio. A veces, incluso existe diferencia entre el establecimiento del cultivo de brotes axilares o de brotes apicales. Los tejidos de plantas leñosas que han sido muy podadas o que se encuentran etioladas producen menos fenoles que aquellos que provienen de partes adultas de la

planta. Se produce mayor ennegrecimiento en brotes que provienen de plantas tomadas del invernadero que en explantes de semillas germinadas asépticamente (George, 1996).

La época del año en el que se toman los explantes también influye en la producción de compuestos fenólicos. La producción de estos compuestos es menor cuando la planta se encuentra en estado de disminución del crecimiento que cuando se encuentra en crecimiento activo o previo a la floración. También se puede producir un ennegrecimiento de los callos o de las suspensiones celulares por la producción de fenoles si no se realiza un subcultivo lo suficientemente frecuente (2-3 semanas).

El ennegrecimiento de los tejidos se produce por la acción de enzimas oxidasas que son sintetizadas o están presentes en los tejidos heridos o senescentes. Los compuestos sintetizados suelen ser mezclas de sustancias fenólicas. A pesar de tener un aspecto semejante, los compuestos fenólicos producidos por plantas de géneros diferentes no tienen la misma composición.

Los fenoles son productos tan lábiles que se oxidan fácilmente. Los productos que se originan por su oxidación pueden ser fitotóxicos y pueden incluso enfatizar los procesos de oxidación, porque después de la oxidación se convierten ellos mismos en oxidantes muy fuertes. La síntesis de los compuestos fenólicos puede ocasionar la aparición de nuevos productos que juegan un importante papel en el mecanismo de protección mecánica del tejido contra la contaminación. Estos productos pueden formar una barrera física conocida como lignina, o funcionar como inhibidores del crecimiento microbiano mediante las quinonas y fitoalexinas. Un grupo especial de fenoles son los protectores de auxinas (antioxidantes que inhiben la oxidación del AIA catalizada por peroxidasas) (Debergh y Read, 1991).

- **Hiperhidricidad (vitrificación)**

La hiperhidricidad se denomina también vitrificación, translucidez, transformación hiperhídrica, glaucosidad y vitrosidad. Produce la aparición de características atípicas en las plantas cultivadas *in vitro* a nivel anatómico, morfológico y fisiológico (George, 1996). Las características de plantas vitrificadas

son una enorme cantidad de agua en los tejidos de las hojas y tallos, una reducción en la producción de las ceras epicuticulares combinado con una gran pérdida de agua, una distorsión del movimiento de los estomas y una anatomía anormal de hojas, tallos y raíces. La baja tasa de supervivencia de las plantas vitrificadas se debe a una inestabilidad de los tallos, hojas cloróticas y retorcidas y una incontrolada pérdida de agua (Reuther, 1988a). Los brotes afectados presentan entrenudos cortos y los brotes apicales aparecen con deformaciones. Normalmente los brotes aparecen hinchados, de color verde claro y las hojas son translúcidas o acuosas o bien de un color verde más oscuro y más gruesas. Se puede producir también una reducción de la dominancia apical produciéndose grupos de brotes atrofiados. Las plantas afectadas no suelen sobrevivir *ex vitro* (George, 1996).

La hiperhidricidad es uno de los efectos fisiológicos que puede ocasionar plantas aberrantes. La saturación de vapor de agua y la acumulación de etileno y CO₂ en recipientes de cultivo sellados se considera que tienen un efecto en el grado de vitrificación. Sin embargo, la composición y la consistencia del medio también influyen en las propiedades estructurales: un alto contenido en citocininas y un bajo contenido de agar en el medio contribuyen al deterioro (Reuther, 1988). Una de las posibles causas de la hiperhidricidad es el fallo de la biosíntesis de lignina (George, 1996).

Para mejorar la tasa de supervivencia de las plantas después de su traspaso a condiciones de invernadero, se han hecho varios intentos con el fin de cambiar la composición del medio y los tipos y sellado de contenedores (Reuther, 1988).

- **Variación somaclonal**

La variación somaclonal se caracteriza por la aparición de nuevos caracteres diferentes a los de las plantas madre debidos al cultivo *in vitro*. Suelen consistir en la aparición de plantas más pequeñas, cambios de color o mosaicos (clorosis, pérdida de quimeras), cambios en el hábito de crecimiento (vigor, forma de las hojas, porte erecto) y cambios en la productividad (esterilidad, juvenilidad más prolongada). En ocasiones estos cambios pueden llegar a crear nuevas variedades.

Las causas de las variaciones producidas en el material cultivado *in vitro* se pueden clasificar en (Swartz, 1991): Expresión de variación que existía en los explantes inicialmente, por ejemplo quimeras debido a la rápida proliferación o a la regeneración adventicia que se produce *in vitro*. Cambios genéticos permanentes debidos a un cambio en el DNA heredable como alteraciones mitóticas, cruzamientos somáticos y poliploidía o aneuploidía (Pintos, 2001). Alteraciones temporales en el comportamiento de las plantas por cambios epigenéticos o efectos fisiológicos que están caracterizadas por cambios no heredables en el fenotipo. Ocurre en un alto porcentaje de las poblaciones propagadas a través de un proceso inducible, dirigido y reversible como la habituación o también por el desarrollo de caracteres ontogénicos.

2.2.7 Ventajas y desventajas de la Micropropagación (Rodriguez, 2012).

- **Ventajas.**

- Propagación acelerada. Es posible teóricamente obtener en un año a partir de una sola planta, un millón de clones de ella.
- Ahorro y ganancia de espacio. En espacio reducido es posible mantener cantidades considerables de clones que servirán como semilla en el campo y permite hacer uso de áreas verticales, acumulando varios niveles para el efecto.
- Ausencia de infecciones y factores climáticos adversos. Debido a las condiciones asépticas en que se tienen los explantes están libres de contaminantes, por lo que se cuenta con material que tiene la capacidad de someterse a las pruebas más rigurosas de cuarentena.
- Disponibilidad inmediata y permanente de material. Permite la propagación de plantas en épocas en que las condiciones de campo no son las adecuadas.

- **Desventajas.**

- Altos costos de mantenimiento e instalación de laboratorio.

- Necesidad de tener mano de obra calificada.
- Falta de precisión en la selección de materiales.
- Pérdida de variabilidad.

2.2.8 Cultivo de tejidos del arándano

En términos generales, la micropropagación, es una forma de propagación vegetativa, caracterizada por manejar condiciones de esterilidad, que posee diversas ventajas tales como, menor tiempo de propagación, exclusión de patógenos y potencial para conservación a largo plazo, respecto a los métodos convencionales. Se ha demostrado que las plantas de arándano derivadas de cultivo de tejido tienen un hábito de crecimiento más tupido, con mayor brotación lateral, mayor desarrollo de corona, mayor cantidad de yemas florales por planta, lo que significa mayor cantidad de frutos y se traduce en mayores producciones. Otra ventaja que presenta la micropropagación es la calidad sanitaria, así como su utilización en variedades que son difíciles de enraizar.

El medio de cultivo más utilizado es el WPM (Woody plantmedium) suplementado con 4 a 5 mg/L de isopenteniladenina (2-iP), 30 g/L de sacarosa. Como fuente de explantes se utilizan segmentos nodales de plantas *in vitro* desarrolladas en el laboratorio o material de campo si se quiere establecer el cultivo. Una vez estéril el material vegetal se procede a la siembra en el medio de cultivo, en la cámara de flujo laminar. Al finalizar la siembra, los frascos son sellados con papel aluminio y llevados a incubación en una cámara de crecimiento o de cultivo.

Para el caso del arándano, es posible realizar el enraizamiento *ex vitro* y la aclimatación al mismo tiempo. (Rodríguez, 2012). 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 en comparación con el 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, con entrenudos cortos. Los

brotos de la última clase son similares a los producidos en semillero y tienen la misma capacidad de supervivencia y proliferación (CutzTax, 2004).

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, más 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 (CutzTax, 2004).

2.3 REACTORES EN CULTIVO IN VITRO

Un reactor es un sistema de cultivo automatizado cuya principal función es proveer un ambiente controlado para lograr óptimas condiciones para el crecimiento celular y para la producción de subproductos. La primera vez que se hizo crecer células vegetales en reactores, fue en 1960 usando varios diseños comerciales y no comerciales adaptados del cultivo de células animales. Un reactor es la parte fundamental de cualquier proceso biológico en el cual los sistemas celulares de microbios, animales o plantas son empleadas para la manufactura de un amplio rango de productos biológicos (Fowler & Warren, 1988).

Los reactores tienen dos ventajas sobre los frascos Erlenmeyer para el cultivo de células vegetales, llamadas control improvisado del ambiente de cultivo y escalamiento. Los birreactores se usan principalmente para:

- Cultivo a gran escala de plantas para biomasa o producción metabólica
- Control continuo o semicontinuo de los parámetros internos del cultivo.
- Automatización de los cultivos.

El desempeño de cualquier reactor depende de muchas funciones, incluyendo:

- Concentración de la biomasa, la cual debe permanecer alta.
- Mantenimiento de las condiciones asépticas.

- Distribución uniforme de los nutrientes y materiales vivientes en el reactor mediante agitación efectiva.
- Control del calor brindado o retirado dependiendo de los requerimientos de los cultivos.
- Creación de las correctas condiciones de corte. Una alta tasa de corte puede ser dañino para las células cultivadas, pero una baja tasa de corte puede ser indeseable también debido a que no se quiere la floculación o la unión de los agregados celulares para el agitador y las paredes del reactor (AKh, 1992).

2.3.1 Tipos de Reactores

Hay diversos diseños de reactores básicos que pueden ser utilizados para cultivo, pero para escoger un óptimo diseño de un reactor para cualquier proceso específico depende del número de parámetros (Panda et al, 1989). Algunos de los parámetros más importantes son la transferencia de oxígeno, el mezclado, y la magnitud del estrés aceptable de corte.

Los reactores pueden ser clasificados en seis categorías, dependiendo principalmente en el método de agitación.

a) Agitación Mecánica.

Este es el tipo más común de reactor usado en el cultivo celular, incluyendo células microbianas y animales, este tipo usa energía mecánica para la transferencia de masa líquido – gas y un mezclado mediante impulsores de diferentes tipos. Las células vegetales son sensibles a una alta tasa de corte asociado con las burbujas de aire que revientan en una velocidad de agitación (Wagner & Vogelmann, 1977). Consecuentemente, la mezcla puede volverse un problema serio. La rotación del impulsor puede conducir la formación de un vórtice el cual puede ser eliminado con el uso de baffles.

Temperatura, pH, la cantidad de oxígeno disuelto y la concentración de nutrientes puede ser más fácilmente controlada dentro de este reactor que con otros tipos. En cultivos microbianos, agitación sirve para el doble propósito de mezclado y la

transferencia de oxígeno. Debido a la sensibilidad de las células vegetales a las fuerzas de corte, velocidades de agitación apropiadas para el cultivo de células vegetales son generalmente insuficientes para romper la corriente de gas entrante en pequeñas burbujas. La corriente de gas se puede dispersar en forma de burbujas finas mediante el uso de un distribuidor de gas apropiada (Payne et al, 1991).

b) Agitación vibratoria.

Estos se caracterizan por la reducción de la espuma y las agrupaciones de células vivas (Tanaka et al, 1983).

c) Agitación con tambores giratorios.

Tales reactores se caracterizan por la rotación de todo el recipiente de cultivo y se utilizan principalmente para la producción de metabolitos. Un mayor rendimiento de biomasa y la productividad pueden ser obtenidos en fermentadores de rotación del tambor que en otros tipos de instrumentos. Tanaka et al. informaron el uso de un reactor de tambor giratorio para cultivar *Catharanthus roseus* y *Lithospermum erythrorhizon* para la producción de shiconina.

d) Agitación con filtro giratorio.

Se elimina el medio gastado, sin una salida corriente, de las células. El filtro giratorio es permeable al medio, pero no a las células cultivadas, lo que permite la eliminación del medio gastado. Sin embargo, se observa con frecuencia que el agregado de células bloquea el filtro. Este tipo de reactor se utiliza para maximizar la producción de embriones somáticos, biomasa y metabolitos (Weathers&Zobel, 1992).

e) Reactor en Fase gaseosa o líquida dispersa.

El medio de cultivo se pulveriza o empaña sobre filtros que llevan las células vivas, evitando el requisito para la agitación. Este tipo de reactor tiene el medio ambiente bajo un cizallamiento óptimo con la máxima transferencia de oxígeno. El líquido y la niebla de rociado se drenan desde la parte inferior del reactor a un depósito y se recirculan (Kim et al, 2002).

f) **Agitación neumática.**

Contrariamente a la agitación mecánica, reactores agitados neumáticamente utilizan el aire para la transferencia de masa gas-líquido y la mezcla. Ellos también son más altos, delgados y no tienen partes móviles. Este tipo de reactor es de columna de burbuja o Airlift. (Choi et al, 2006) Las ventajas de un reactor de columna de burbuja son:

- Cizalla inferior, lo que significa que tal reactor puede ser utilizado para el cultivo de células de plantas sensibles al cizallamiento.
- Mayor presión en la parte inferior del recipiente, lo que aumenta la solubilidad del oxígeno.
- Es más fácil mantener la esterilidad debido a la ausencia del eje del agitador.

Desventajas de un reactor Airlift:

- Los costos de energía altos, ya que el aire tiene que ser forzado en el medio bajo una mayor presión.
- El reactor no es adecuado para el cultivo de alta densidad debido a un mezclado insuficiente en el interior del bioreactor.
- La separación de gas desde el líquido no es muy eficiente cuando la espuma es presentar.

El diseño de la columna de burbujas se caracteriza, como su nombre indica, por la formación de burbujas. Proporciona bajo cizallamiento y la producción de biomasa satisfactoria y la transferencia de oxígeno (Panda et al, 1989). Sin embargo, a altas densidades de inóculo, la columna de la burbuja se ha observado para reducir el rendimiento del crecimiento (Titze et al, 2004).

2.3.2 Aspectos importantes de los sistemas RITA®

En el año 1993, un nuevo sistema de inmersión conocido como RITA®, por sus siglas en Francés: Récepteur à immersion temporaire automatique, fue desarrollado en CIRAD (Centre de coopération Internationale en recherche agronomique pour le développement) en Francia. Estos nuevos reactores de inmersión temporal proponen

un sistema donde un solo envase contiene el medio líquido y los cultivos, donde por acción de flujos de aire comprimido filtrado, el medio de cultivo es desplazado hacia la parte superior donde se encuentran los cultivos. Ambos se ponen en contacto durante el tiempo de inmersión. Una vez finalizado este periodo el flujo de aire es cortado y el medio de cultivo desciende nuevamente por acción de la gravedad.

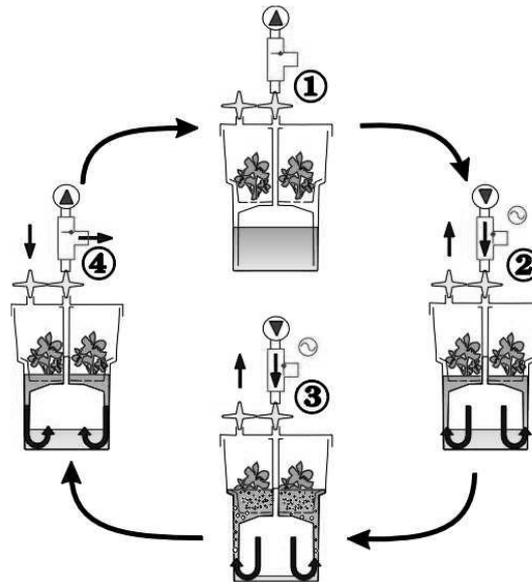


Figura N° 5: *Funcionamiento de un sistema RITA®. En cuatro etapas.*

Obtenido de: Vitro Pic S.A.

En la Figura N° 5 se muestra el funcionamiento de un sistema RITA® especificando cada una de las etapas de funcionamiento: 1) Los explantes están colocados sobre un disco de esponja de poliuretano. 2) Una sobrepresión de aire estéril, aplicada en la parte baja, permite al medio de cultivo subir a la parte alta donde se encuentran los explantes. 3) El aire inyectado permite la oxigenación del medio. El aire de la parte alta se renueva totalmente. 4) Pasado el tiempo de inmersión, la bomba de aire se apaga. Las presiones se equilibran, y el medio vuelve a bajar por gravedad a la parte inferior. Por capilaridad, una fina película de medio se mantiene en contacto sobre los explantes.

El RITA® es un sistema de bajo costo, es un reactor airliftsemi-prescindible, el cual tiene diferentes partes como se muestra en la Figura N° 6. Su principio de

funcionamiento se basa en la combinación de la nutrición del cultivo y la aireación a través de la inundación temporal de una cámara, que se encuentra en la parte inferior del bioreactor, con medio nutriente líquido (Kim et al, 2002). Por bombeo de aire en la cámara inferior, el medio líquido es forzado en la cámara superior del bioreactor, que contiene el tejido de la planta cultivada. Las cámaras están separadas una de otra por medio de un tamiz. De esta manera, se consigue una inmersión temporal del cultivo en el medio nutriente. El tiempo necesario para el llenado de la cámara inferior con aire es de 30-60 s y depende de la densidad del medio líquido y el volumen de aire que queda en la cámara. Después de transcurrido este tiempo, las burbujas de aire pasan por el tamiz de la parte inferior de la cámara superior, aireando así el cultivo.

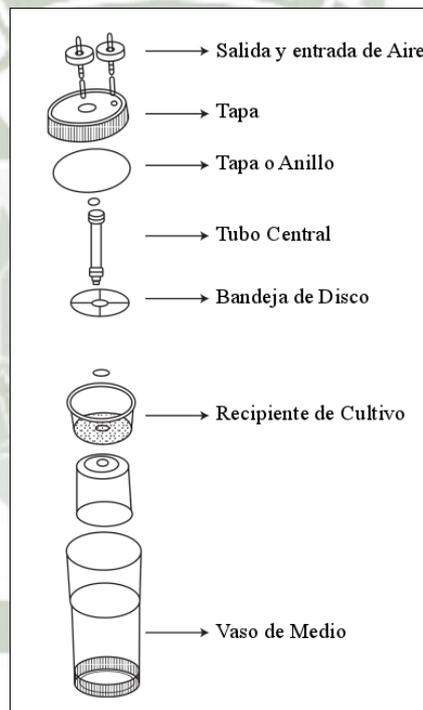


Figura N° 6: *Partes de un sistema Rita*

Fuente: Elaboración propia

Partes de un sistema RITA®:

- Recipiente mediano (la cámara baja, en la que se bombea aire)
- Cesta de cultivo (la cámara alta, que contiene las células de las plantas cultivadas)
- Colador de plástico en forma de disco (que sostiene el inóculo de cultivo)
- Tubo que permite que el aire bombeado llegue al recipiente inferior
- Válvulas de purga de aire (rodamiento 0,2 micras filtros esterilizantes) en la entrada y salida de aire
- Bomba de aire

2.3.3 Reactores Twin flasks

Un diseño típico que utiliza dos envases (plástico o vidrio) es conocido como sistema Twin flasks de los cuales uno contiene el medio líquido y el otro los explantes, tal como se muestra en la figura N° 7. Estos envases están unidos por la parte superior a través de unas mangueras esterilizadas que se extienden hasta la base. Durante el periodo de inmersión un flujo de aire es introducido por la parte superior del frasco que contiene el medio de cultivo, lo que permite desplazar el medio hacia el frasco donde se encuentran los explantes. Cuando el tiempo de inmersión finaliza, el aire que ingreso por el frasco del medio de cultivo es cortado y otro flujo de aire ingresa por el frasco donde los cultivos, el cual hace retornar todo el medio de cultivo al frasco original. Estos ciclos se repiten varias veces durante el día, dependiendo del tipo de cultivo que se está realizando.

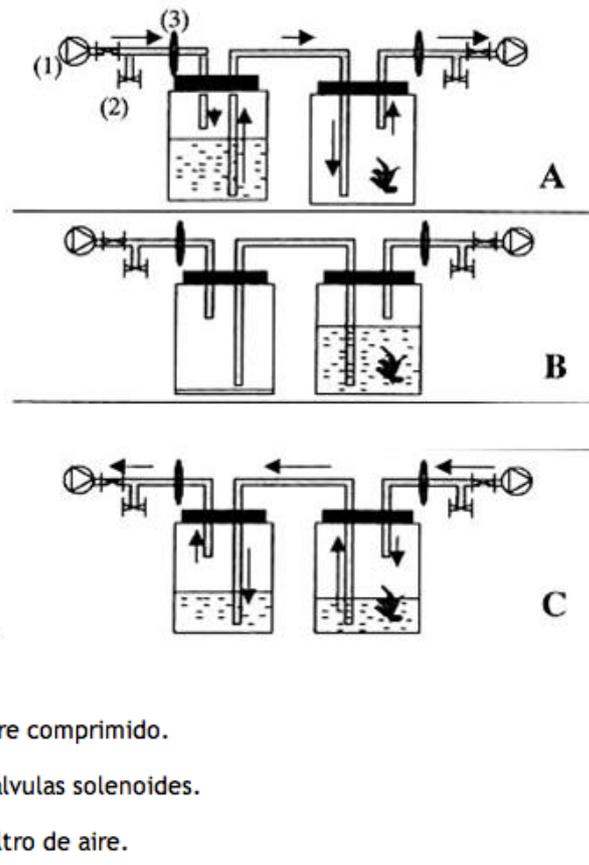


Figura N° 7: *Funcionamiento de los reactores Twin flasks*

Fuente: Vitro Pic S.A.

2.3.4 Ventajas de un Reactor de inmersión temporal

- Inmersión Periódica del medio

Se introducen 2 variables al control de crecimiento de los explantes, las cuales son el tiempo de inmersión y la frecuencia de inmersión, las cuales contribuyen para un mejor flujo de nutrientes del medio hacia las plantas.

- Mayor multiplicación de la planta

Una clara ventaja es que se incrementa la tasa de multiplicación de la planta, ya que en reactores de inmersión temporal los explantes obtienen un coeficiente de multiplicación más elevado.

- Reducción del espacio

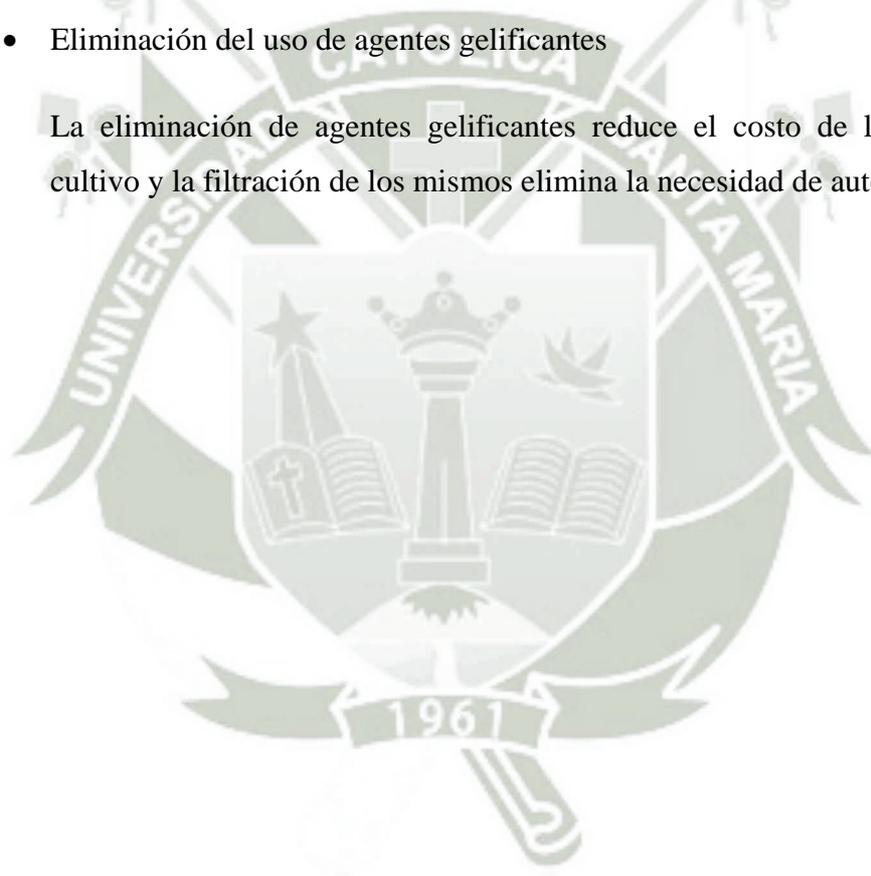
La densidad de los medios de cultivo líquidos es mucho mayor que en medios sólidos, esto hace que el espacio necesario para su operación sea mucho menor. La reducción del espacio conlleva a una disminución en los requerimientos de energía para la iluminación y refrigeración.

- Reducción de mano de obra

Al reducir el espacio de trabajo también se reduce la mano de obra, ya que se requieren menos operarios y hacen que los costos de operación sean menores.

- Eliminación del uso de agentes gelificantes

La eliminación de agentes gelificantes reduce el costo de los medios de cultivo y la filtración de los mismos elimina la necesidad de autoclavado.



CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Material vegetal

Se utilizó segmentos de tallo obtenidos a partir de plantas madre de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano de arbusto alto) de la variedad Misty tal como se muestra en la Figura N° 8, las cuales fueron adquiridas de la empresa “Frutícola la Joyita” en el distrito de la Joya (Altitud: 1617 msnm, Latitud: 16°25’26” Sur, Longitud: 71°49’14” Oeste), en la ciudad de Arequipa.

Las plantas se mantuvieron en un vivero de donde periódicamente se extraían los explantes utilizados en la experimentación, tal como se muestra en el Apéndice N° 14. El sustrato utilizado para mantener las plantas madre en el vivero fue preparado utilizando las siguientes proporciones de turba rubia, humus y arena de río 2:1:1.



Figura N° 8: *Planta madre de arándano de 1 año de edad*

3.1.2 Material de laboratorio

a) Equipos

- Autoclave HW KESSEL, modelo 290104
- Balanza Portátil OHAUS SCOUT PRO 200 g, modelo SP202
- Bombas de Aire
- Cámara de flujo laminar Compañía C4
- Cocina Eléctrica MAGEFESA, modelo MGF 8022
- Estufa Eléctrica JP SELECTA S.A., modelo CONTERM
- Micropipeta de 1000 uL y 50 uL Biohit
- Microscopio CARL ZEISS modelo “PRIMO STAR”
- pH-metro HANNA INSTRUMENTS, modelo pH213
- Refrigerador COLDEX, modelo CA-29

b) Material de vidrio

- Baguetas de vidrio
- Fiolas de 100 mL, 500 mL, 1000 mL BOECO
- Pípetas de 0,5 mL, 1 mL, 5 mL y 10 mL TEKK KIMAX
- Probetas de 500 mL y 100 mL KIMAX
- Tubos de ensayo de 30 mL KIMAX
- Vasos de precipitado de 100 mL, 500 mL y 1000 mL SCHOTT DURAN

c) Reactivos

- 2-isopenteniladenina (2-iP) q. p. SIGMA ALDRICH
- Ácido bórico (H_3BO_3)q.p. LERTHE
- Ácido etilenediominatetraacético ($Na_2EDTA.2H_2O$)q.p. J.T. BAKER
- Ácido Naftalen acético (ANA) q. p. SIGMA ALDRICH
- Acido nicotínico q. p. SIGMA ALDRICH
- Agar – Agar DIFCO q.p. J.T. BAKER
- Cloruro de calcio ($CaCl_2.2H_2O$) q.p. LERTHE
- Etanol 96% v/v NACIONAL
- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) q.p. LERTHE
- Glicina q. p. SIGMA ALDRICH
- Hipoclorito de sodio NaClO 4.9% (lejía comercial) CLOROX
- Mio-inositolq. p. SIGMA ALDRICH
- Molibdato de sodio ($Na_2MoO_4.2H_2O$) q.p. J.T. BAKER
- Nitrato de amonio (NH_4NO_3)q.p. J.T. BAKER
- nitrato de calcio ($Ca(NO_3)_2$) q.p. LERTHE
- Piridoxina.HCl q. p. SIGMA ALDRICH
- Sacarosa
- Sulfato de cobre ($CuSO_4.5H_2O$) q.p. J.T. BAKER
- Sulfato de magnesio ($MgSO_4.7H_2O$) q.p. LERTHE

- Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) q.p. LERTHE
- sulfato de potasio (K_2SO_4) q.p. LERTHE
- Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) q.p. LERTHE
- Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) q.p. J.T. BAKER
- Tiamina. HClq. p. SIGMA ALDRICH

d) Otros

- Bisturí
- Bolsas de Polipropileno
- Goma espuma de 23 Kg/m^3 de densidad
- Manguera de plástico transparente 3/8''
- Papel Aluminio
- Pinzas
- Plástico Adherente (PlasticWrap) "U-Thil Film" CORSUN Perú
- Recipientes de plástico de 3L
- Tapers de polipropileno de 500 mL
- Tijeras de podar
- Soldimix

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Localización del ensayo

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Católica de Santa María, en la ciudad de Arequipa (Perú), cuya ubicación geográfica es la siguiente: Latitud: 16° 28 Sur, Longitud: 71° 27 Oeste y Altitud: 2400 msnm.

3.2.2 Preparación de Soluciones Stock para el medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium).

Para la elaboración del medio de cultivo WPM de LLOYD & MCCOWN (1981), se prepararon soluciones stock de cada una de las sales requeridas, tanto macronutrientes como micronutrientes y de vitaminas según la concentración deseada. Estas soluciones fueron mantenidas en frascos de vidrio color ambar para evitar alguna reacción desfavorable por acción de la luz, en el caso de las soluciones stock correspondientes a los macronutrientes y micronutrientes fueron mantenidas a 4 °C, pero en el caso de las hormonas y vitaminas estas fueron conservadas a – 20 °C para conservar sus propiedades.

Las soluciones que se prepararon para la elaboración de los medios de cultivo, se detallan en el Apéndice N° 1.

3.2.3 Recolección del material vegetal

Fundamento:

La elección del explante apropiado es el primer paso para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, la cual está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. La propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas leñosas requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles (Bonga, 1980).

El estado fisiológico de la planta madre influye significativamente en su capacidad morfológica. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado este el tejido que

se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos et al., 1982).

También se ha observado que las yemas axilares, obtenidas de la parte media del tallo, se desarrollan más rápidamente que las obtenidas de la base o la porción apical (Bressan et al., 1982).

Procedimiento:

Se utilizó como explantes segmentos nodales obtenidos a partir de plantas madre de *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano de arbusto alto) de la variedad Misty, las cuales fueron adquiridas de la empresa “Frutícola la Joyita”. Las plantas madre tenían 1 año de edad y se encontraban en el vivero acondicionado para el presente trabajo, tal como se muestra en el Apéndice N° 13. Los explantes seleccionados presentaron un aspecto saludable, con buenas características morfológicas y de sanidad (vigorosas, libe de plagas y enfermedades). Para reducir la contaminación durante la etapa de establecimiento *in vitro*, se seleccionaron ramas de aproximadamente 15 cm que contenían numerosas yemas provenientes de las partes juveniles de la planta, las cuales se encontraban en activo crecimiento, lo cual hizo más rápida la brotación *in vitro*. Los cortes se realizaron con una tijera previamente desinfectada con etanol al 96% para evitar la contaminación, además se almacenaron en un recipiente de plástico para prevenir la deshidratación durante su transporte hasta el laboratorio, donde se retiraron las hojas como se observa en la Figura N° 9.



Figura N° 9: Explantes de Arándano Misty utilizados en la investigación

El establecimiento *in vitro* se realizó para obtener explantes libres de contaminantes superficiales y también para que estas se adapten al medio de cultivo empleado para su propagación.

3.2.4 Establecimiento *in Vitro*

Fundamento:

Es importante considerar el hecho de que el aislamiento de un tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de estrés que altera su metabolismo celular y su balance hormonal. Un buen explante es aquel cuyas células sobreviven, en una alta proporción bajo las condiciones *in vitro* (Roca & Mrognski, 1993).

Para obtener cultivo asépticos es necesario trabajar en ambientes adecuados, esterilizar los medios de cultivo, desinfectar superficialmente los explantes y realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia (Roca & Mrognski, 1993).

Es conveniente, que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a luz y temperatura. Las respuestas morfogénicas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación, así como por la calidad, intensidad y duración de la luz (Martin, 1980; Huges, 1981).

Para propósitos generales Roca y Migronski (1993) sugieren utilizar, en el establecimiento de los cultivo *in vitro* una fuente luminosa compuesta de una lámpara fluorescentes que brinde entre 1000 y 4000 lux de iluminación con un fotoperiodo de 16/8 h. y una temperatura entre 25 y 28 °C.

a) Preparación del medio de cultivo

Fundamento:

Es necesario preparar el medio de cultivo con sustancias químicas de un alto grado de pureza utilizando agua destilada. El procedimiento para la preparación de los medios dependerá, del tipo de medio, de su consistencia y de la presencia de componentes termolábiles. Se debe evitar el almacenamiento prolongado del medio para evitar la acumulación de contaminantes.

Procedimiento:

Se preparó el medio de cultivo base para especies semileñosas WPM, cuya composición se muestra en el Apéndice N°1, además se suplementó con 3% de sacarosa y 0.8% de agar. El pH se ajustó a 5.0 regulado HCl 1N, o NaOH 1N (Mejía, 1994).

Se vertió 10 mL de medio de cultivo en cada tubo de ensayo, luego se tapó con papel aluminio y se procedió a autoclavar durante 15 minutos, 15 libras de presión y 121 °C de temperatura.

b) Desinfestación superficial de los explantes**Fundamento:**

Una vez seleccionado el mejor explante, se requiere desinfectarlo superficialmente debido a que en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante.

Evitar la contaminación con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su ulterior incubación y manipulación.

Generalmente se considera que los tejidos de las plantas intactas y sanas son asépticos internamente y que la principal tarea de limpieza del material para explantes está limitada a la esterilización superficial (Roca & Mrognski, 1993).

Existen diferentes compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizado el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 3% contenido en productos comerciales.

Es conveniente agitar el explante conjuntamente con la solución desinfectante. Después de tratar el explante con las soluciones desinfectantes es necesario remover

los restos del producto, mediante varios lavados con agua destilada estéril y operando en la cámara de transferencia.

Procedimiento:

Los explantes fueron cortados en segmentos de 4 yemas axilares, se retiraron las hojas y se realizó un lavado con detergente comercial durante 10 min, luego se enjuagó con agua destilada. Después se sumergieron durante 30 s en una solución de etanol al 70% seguidamente se sometieron a tres concentraciones de hipoclorito de sodio comercial (0.12%, 0.25%, 0.49% v/v), durante 2 y 5 min (Tabla N°3). En la cámara de flujo laminar, los explantes se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril hasta eliminar los residuos de Hipoclorito de sodio, y se tomaron como explantes secciones de tallo de 1 cm de longitud con una yema axilar. Se colocó un explante en cada tubo de ensayo de vidrio de 30 mL conteniendo 10 mL de medio de cultivo de cultivo WPM.

Cada tratamiento de desinfección constó de 30 unidades experimentales (tubos de ensayo). A los 10 días después de la siembra se registraron los porcentajes de contaminación por hongos y bacterias, de explantes oxidados y de explantes viables.

Tabla N° 3:

Tratamiento de desinfección evaluados

Tratamiento	Concentración de Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de Inmersión (min)
1	0.12	2
2	0.25	2
3	0.49	2
4	0.12	5
5	0.25	5
6	0.49	5

3.2.5 Evaluación del efecto los reguladores de crecimiento citocinina 2-iP (6 (γ,γ- dimetilalilamino) purina) y auxina ANA (Ácido naftalen acético) en el desarrollo de brotes de *Vaccinium corymbosum* L. variedad Misty

Se preparó el medio WPM (ApéndiceN°1), suplementado con 3% de sacarosa y 0.8% de agar. El pH se ajustó a 5.0 regulado HCl 1N, o NaOH 1N (Mejía, 1994).

Para evaluar el efecto de la citoquinina 2-iP, se utilizaron 4 diferentes concentraciones: 14.8 μM, 24.6μM, 34.4μM y 44.3μM. En el caso de la Auxina ANA, se utilizaron 3 concentraciones: 0 μM, 2.7μM y 5.4 μM. Esto resultó en 15 tratamientos con diferentes concentraciones de 2-iP/ANA, con 5 repeticiones por tratamiento como se muestra en la Tabla N° 4.

Tabla N°4:

Tratamientos utilizados en la fase de multiplicación.

Tratamiento	2-iP (μM)	ANA (μM)
1	0	0
2	0	5.4
3	0	10.7
4	14.8	0
5	14.8	5.4
6	14.8	10.7
7	24.6	0
8	24.6	5.4
9	24.6	10.7
10	34.4	0
11	34.4	5.4
12	34.4	10.7
13	44.3	0
14	44.3	5.4
15	44.3	10.7

Se vertió 10 mL de medio de cultivo en cada tubo de ensayo, luego se tapó con papel

aluminio y se procedió a autoclavar durante 15 minutos, 15 libras de presión y 121 °C de temperatura. El procedimiento para la siembra de los explantes en el medio de cultivo se observa en la Figura N° 10. Para cada tratamiento se realizaron 5 repeticiones. Las condiciones experimentales usadas fueron las establecidas por Villalobos et al (1991) y Mejia (1994):

- Fotoperiodo: 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad
- Intensidad lumínica: proporcionada por tubos fluorescentes de 2000 a 2500 lux
- Temperatura: 20 ± 3 °C
- Humedad: 60-70%

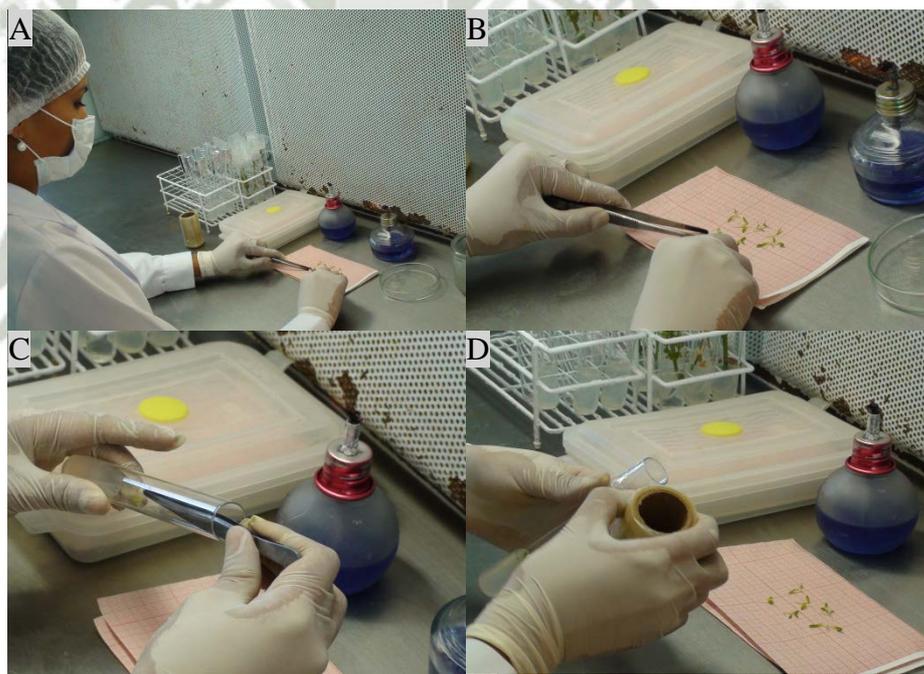


Figura N° 10: *Procedimiento seguido para la multiplicación de brotes. A) Extracción de los explantes en la cámara de flujo laminar. B) Corte de los brote en segmentos nodales de aproximadamente 1 cm. C) Siembra en el medio de cultivo. D) Sellado de los tubos de ensayo.*

La evaluación se realizó cada semana, durante 60 días, considerando los siguientes indicadores:

- Longitud del brote (cm)
- Número de Hojas (hojas/brote)
- Formación de callo (%)

Finalmente con los datos obtenidos se determinó el Coeficiente de Multiplicación (CM), el coeficiente de multiplicación fue determinado dividiendo el número final de yemas entre el número inicial de explantes. El coeficiente de multiplicación se calculó a los 60 días después introducidos los explantes de la misma forma que Espinosa (2008) y Tejada (2010).

$$CM = \frac{\text{Número de yemas finales}}{\text{Número yemas iniciales}}$$

3.2.6 Diseño construcción del reactor de inmersión temporal

Fundamento:

Para el diseño y construcción del reactor de inmersión temporal se tomó como referencia el sistema RITA®. Se utilizaron materiales de plástico que soportaron la esterilización húmeda en autoclave, las dimensiones del reactor diseñado se muestran en el Apéndice N° 15. Se construyó un reactor con agitación neumática impulsado con una bomba de pecera de 2W de potencia, capaz de impulsar 3 L/min. El medio es impulsado con el aire que ingresa con lo cual no solo sumerge las plantas en el medio de cultivo, sino que también les brinda aireación.

Las bombas usadas en los reactores de inmersión temporal están conectadas a temporizadores con los cuales se controla el tiempo y la frecuencia de inmersión.

a) Preparación del medio de cultivo líquido

Se preparó el medio de cultivo Woody Plant Medium de LLOYD & MCCOWN (1981) utilizando las soluciones stock de macronutrientes, micronutrientes, y

vitaminas preparados; además se agregó sacarosa (30g/L), 2-iP (34.4 μ M). El pH se ajustó a 5.0 regulado con ácido clorhídrico (HCl) 1N, o hidróxido de Sodio (NaOH) 1N (Mejía, 1994).

Se vertió 500 mL de medio de cultivo en cada recipiente, luego se tapó con papel aluminio y se procedió a autoclavar durante 15 minutos, 15 libras de presión y 121°C de temperatura.



Figura N° 11: *Reactor de Inmersión Temporal Automático (RITA®)*
Obtenido de: CIRAD, Francia

b) **Diseño del Reactor de Inmersión Temporal**

Para el diseño del Reactor de Inmersión Temporal se tomó como referencia el reactor RITA® diseñado en el CIRAD, Francia (Figura N° 11).

El reactor de inmersión temporal diseñado consta de un recipiente de plástico de 3L de volumen como envase principal, un recipiente de polipropileno de 500 mL de soporte para las plantas el cual tiene pequeñas perforaciones para la entrada y salida del medio de cultivo, un recipiente de plástico invertido, un tubo central de vidrio para la entrada de aire y como soporte del recipiente contenedor de las plantas, una conexión de manguera para la entrada de aire y otra para la salida de aire, las cuales llevan un filtro de esponja (23kg/cm³) de 5cm de largo y 1.5 cm de diámetro (Figura N° 12).

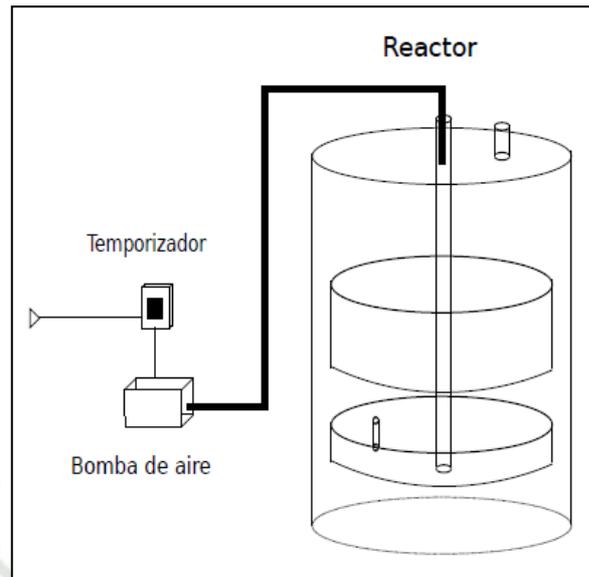


Figura N° 12: Partes principales del reactor de inmersión temporal automatizado.

3.2.7 Determinación de la frecuencia y el tiempo de inmersión óptimos para el desarrollo de los explantes de *Vaccinium corymbosum* L. cultivar Misty.

En cada reactor RITA conteniendo 500 mL de medio de cultivo WPM se colocó 15 explantes de arándano, los cuales fueron segmentos nodales seleccionados previamente. Se evaluó los tiempos y frecuencias de inmersión que se muestran en la Tabla N° 5.

Tabla N° 5:

Tratamientos para la evaluación de la frecuencia y el tiempo de inmersión.

Tratamiento	Frecuencia (inmersión/día)	Frecuencia (h)	Tiempo de Inmersión (min)
T1	2	12	1
T2	4	6	1
T3	8	3	1
T4	2	12	3
T5	4	6	3
T6	8	3	3
T7	2	12	6
T8	4	6	6
T9	8	3	6

Las condiciones experimentales usadas fueron las establecidas por Villalobos et al (1991) y Mejia (1994).

Al finalizar el ensayo, a los 60 días, para cada tratamiento se evaluó los parámetros siguientes:

- Longitud del brote (cm).
- Número de Hojas (hojas/ brote)
- Coeficiente de multiplicación: $\frac{\text{Número de yemas finales}}{\text{Número yemas iniciales}}$

3.2.8 Evaluación del Enraizamiento *in vitro*

Para la inducción del enraizamiento *in vitro* se utilizaron microtallos provenientes de la etapa de multiplicación en medio sólido, se cultivaron en medio WPM (Apéndice N°1), suplementado con 3% de sacarosa, 0.8% de agar y tres concentraciones de la auxina ANA, tal como se muestra en la Tabla N° 6. El pH se ajustó a 5.0 regulado HCl 1N, o NaOH 1N luego se vertió 10 mL de medio de

cultivo en cada tubo de ensayo y se procedió a autoclavar durante 15 minutos, 15 libras de presión y 121°C de temperatura.

Para el enraizamiento *in vitro* de Arándano de la variedad Misty se evaluaron 5 tratamientos con 5 repeticiones y diferentes concentraciones de la auxina ANA, los cuales se muestran en la Tabla N° 6.

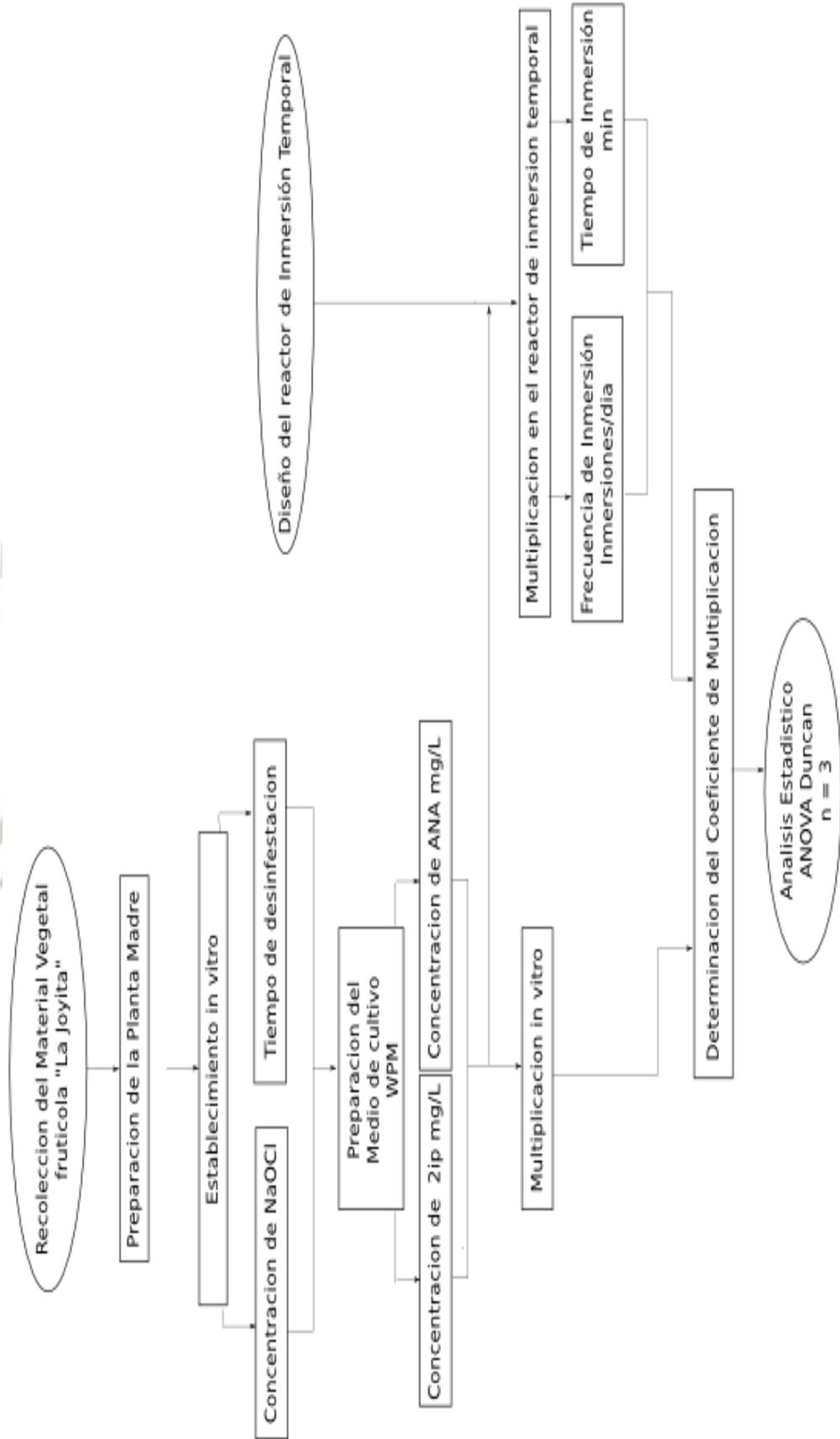
Tabla N° 6:

Tratamientos para la inducción del enraizamiento de Vaccinium corymbosum L. variedad Misty

Tratamiento	ANA (μM)
T1	10.7
T2	16.1
T3	21.5
T4	26.9
T5	32.2

Las condiciones de incubación fueron las mismas que en la etapa de multiplicación. La evaluación de los resultados se realizó a los 60 días.

3.3 DIAGRAMA DE ACTIVIDADES



CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Desinfestación superficial del material vegetal.

En el proceso de propagación *in vitro* es importante la etapa de desinfestación del material vegetal, con la finalidad de obtener un material vegetal viable para la continuación de las siguientes etapas de la propagación *in vitro*.

En la Tabla N° 7 se muestran los resultados obtenidos utilizando diferentes concentraciones (v/v) de hipoclorito de sodio en tiempos de 2 y 5 minutos.

Tabla N° 7:

Porcentaje de segmentos nodales de V. corymbosum variedad Misty no contaminados y contaminados después del tratamiento con 3 diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio.

Tratamientos	% Explantos No contaminados			% Explantos Contaminados		
	% de explantes viables	% de explantes oxidados	Total	% Bacterias	% Hongos	Total
T1 (0.12% NaOCl) 2 min	56.67	0.00	56.67	26.67	16.67	43.33
T2 (0.25% NaOCl) 2 min	66.67	0.00	66.67	16.67	16.67	33.33
T3 (0.49% NaOCl) 2 min	63.33	23.33	86.67	0.00	13.33	13.33
T4 (0.12% NaOCl) 5 min	83.33	0.00	83.33	6.67	10.00	16.67
T5 (0.25% NaOCl) 5 min	80.00	10.00	90.00	0.00	10.00	10.00
T6 (0.49% NaOCl) 5 min	53.33	40.00	93.33	0.00	6.67	6.67

Como podemos observar la mayor viabilidad (83%), se obtuvo con el hipoclorito de sodio al 0.12 % durante 5 minutos (tratamiento 4), a los 10 días se observó la brotación de las yemas axilares en el total de los explantes viables (Figura N° 13C).

La menor contaminación (6.67 %) se obtuvo con hipoclorito de sodio al 0.49 % v/v durante 5 minutos (Tratamiento 6), pero solo se logró un 53.3 % de explantes viables y un 40 % de explantes oxidados, por eso se descartó este tratamiento.

El mayor porcentaje de contaminación se obtuvo con 0.12% de hipoclorito de sodio durante 2 minutos (Tratamiento 1). La contaminación se generó principalmente por hongos, la cual se observó en diferentes porcentajes en el total de tratamientos, el tratamiento 1 fue el que presentó el porcentaje más alto (16.67 %) de contaminación por hongos (Figura N° 13A).

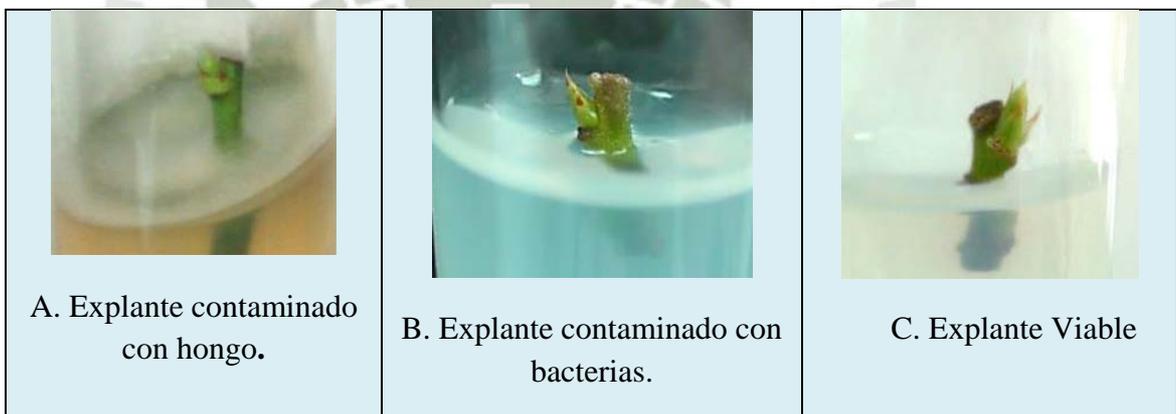


Figura N° 13: *Explantes de arándano a los 10 días de cultivo*

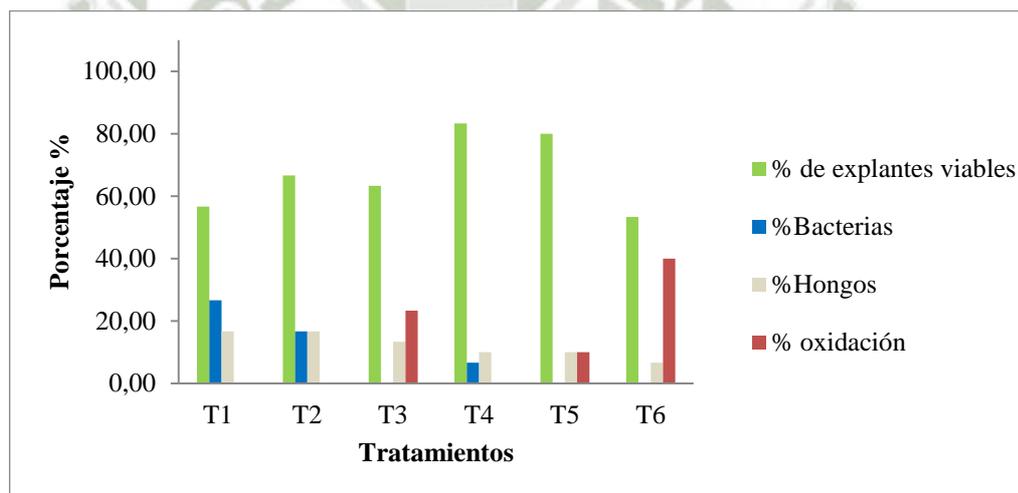
Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que no se requiere grandes cantidades de hipoclorito de sodio (0.12 %) para desinfectar los explantes de arándano cuando estos provienen de viveros con condiciones fitosanitarias controladas, similar a lo informado por Debnath et al. (2008) quien obtuvo 75% a 85% de explantes asépticos de arándano lowbush (*Vaccinium angustifolium Ait*) cuando utilizó hipoclorito de sodio al 0.12 % v/v y solo cuantificó de 5 a 10 % de explantes contaminados. Algunos autores como Meiners et al. (2007) afirman que la contaminación depende de la época de colecta de los explantes, debido a que estos son afectados por las diferentes estaciones del año.

En cuanto a la oxidación, tal como se muestra en la Figura N° 14, el porcentaje más

alto (40 %) lo presentó el tratamiento 6; mientras que por el contrario los tratamientos 1, 2 y 4 no presentaron oxidación.

La oxidación es producida por los radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizados por la enzima polifenol oxidasa (ppo) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Bray et al. 2000). Este fenómeno ocurre principalmente cuando se utiliza desinfectantes con el hipoclorito de sodio; el problema en arándano podría evitarse con el uso de carbón activado como sugiere Azofeita (2009).

Figura N° 14: Efecto de los diferentes tratamientos de desinfección en el % de explantes viables, % de explantes contaminados con bacterias y % de explantes contaminados con hongos.



Al finalizar la etapa de establecimiento *in vitro*, después de 30 días de cultivo, los segmentos nodales de arándano de la variedad Misty mostraron vigorosidad y alcanzaron una altura de 3 a 4 cm como se observa en la Figura N° 15.



Figura N° 15: *Explantos de arándano Misty a los 30 días después de la establecimiento in vitro.*

4.2 Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento citoquinina (2-iP) y auxina (ANA) en el desarrollo de brotes axilares de *Vaccinium corymbosum L.* variedad Mysti.

En esta etapa de la experimentación se muestra el efecto conjunto de los reguladores de crecimiento citoquina 2-iP (2-isopenteniladenina) y auxina ANA (Ácido naftalen-acético) en la altura, el número de hojas, el coeficiente de multiplicación (CM) y la formación de callo, de brotes axilares de *Vaccinium corymbosum L.* de la variedad Mysti. Se tomaron en cuenta las concentraciones de 0, 14.8, 24.6, 34.4 y 44.3 μ M de 2-iP y 0, 2.7 y 5.4 μ M de ANA.

4.2.1 Análisis de la altura de los brotes

Al realizar la prueba estadística ANOVA, Apéndice N° 2, para los valores de la altura de los brotes obtenidos en los 15 tratamientos realizados (Tabla N° 8) podemos decir que existe diferencia significativa al 95% para el tratamiento 10 de 2-iP a 34.4 μ M y ANA a 0 μ M en el cual tenemos la mayor altura promedio de brote 3.5 cm, tal como se muestra en la Tabla N° 8. Además, se observó que a medida que se incrementa la concentración de la auxina (ANA) disminuye la altura de los brotes.

La disminución de altura con el incremento de la concentración de ANA podría deberse a que concentraciones altas de auxina estimulan la producción de etileno y retrasan la elongación celular (George, 2008).

Los resultados obtenidos en la experimentación fueron similares a los obtenidos por Zimmerman (1980), quien reporta que las dosis de 24.6 y 34.4 μ M de 2-iP, producen una altura entre 3 y 6 centímetros, en el cultivo de arándano, en la variedad “Berkeley”.

Gonzalez *et al.* (2000) consiguieron resultados satisfactorios en el cultivo *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L. a partir de segmentos nodales, en medio WPM con 24.6 μ M de citocinina (2-IP) y en ausencia de auxina. Lo cual nos indica que es posible la multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de *Vaccinium corymbosum* L. sin el uso de auxinas como reguladores de crecimiento.

Después de realizar el análisis estadístico, Apéndice N° 2, obtenemos los grupos con diferencia significativa entre los tratamientos propuestos, tal como se observa en la Tabla N° 8, donde el tratamiento de 2-iP a 34.4 μ M y ANA a 0 μ M, es el tratamiento con los valores más elevados y además muestra diferencia significativa respecto a los demás grupos.

Tabla N° 8:

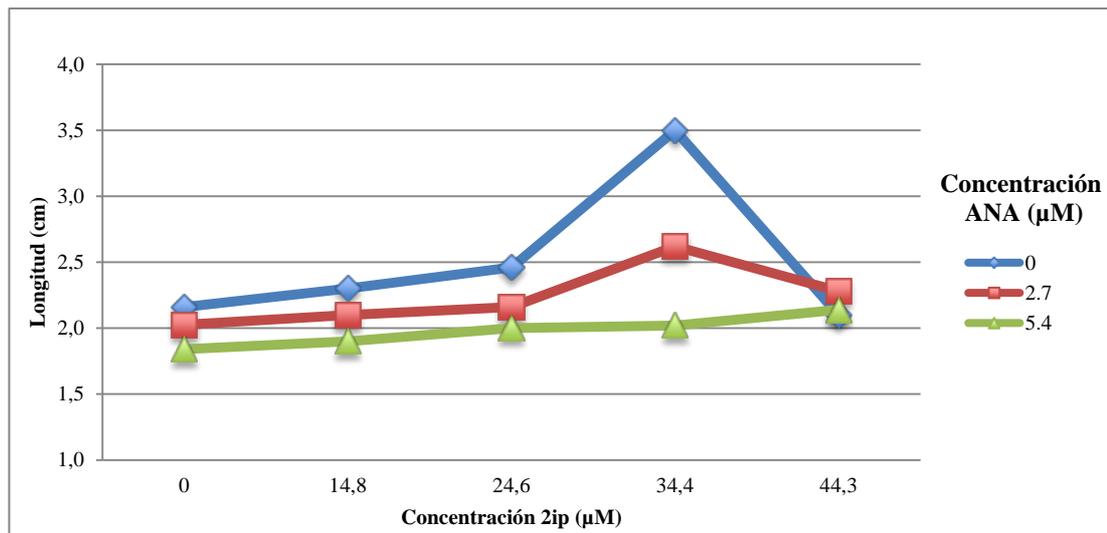
Promedios de la altura (cm) de los brotes de Vaccinium corymbosum L. variedad Misty desarrollada según tratamiento (concentración de 2-iP y ANA).

2ip μ M	ANA μ M		
	0	2.7	5.4
0	2.17 _{bc}	2.06 _{bc}	1.86 _c
14.8	2.32 _{bc}	2.08 _{bc}	1.92 _c
24.6	2.46 _b	2.16 _{bc}	2.0 _c
34.4	3.50 _a	2.62 _b	2.02 _c
44.3	2.10 _{bc}	2.32 _{bc}	2.14 _{bc}

Por otro lado Robles (2003), empleó concentraciones de 2-iP más elevadas, al utilizar brotes como explantes, utilizando 49.2 μ M de 2-iP, y obtuvo 2.2 centímetros de altura de planta en la variedad Misty y en la variedad Tifblue obtuvo una altura de 0.9 centímetros utilizando 73.8 μ M de 2-IP.

En la Figura N° 16 podemos observar que la altura de los brotes incrementa a medida que la concentración de citocinina 2-iP también incrementa, pero cuando se llegan a concentraciones elevadas de citocinina (2i-P) 44.3 μM la altura cae drásticamente.

Figura N° 16: *Efecto de la auxina (ANA) y citocinina (2-iP) en la altura promedio de los brotes en la fase de multiplicación in vitro.*



Según la Figura N° 16 con la combinación 44.3 μM de 2-iP y 0 μM de ANA se produce una reducción en la altura, lo cual se debe a que el efecto del 2-iP es beneficioso para el explante hasta cierta concentración, ya que a mayores concentraciones es perjudicial para el explante y hasta puede llegar a inducir la producción de callos, tal como lo indican Marcotrigiano&McGlew (1991).

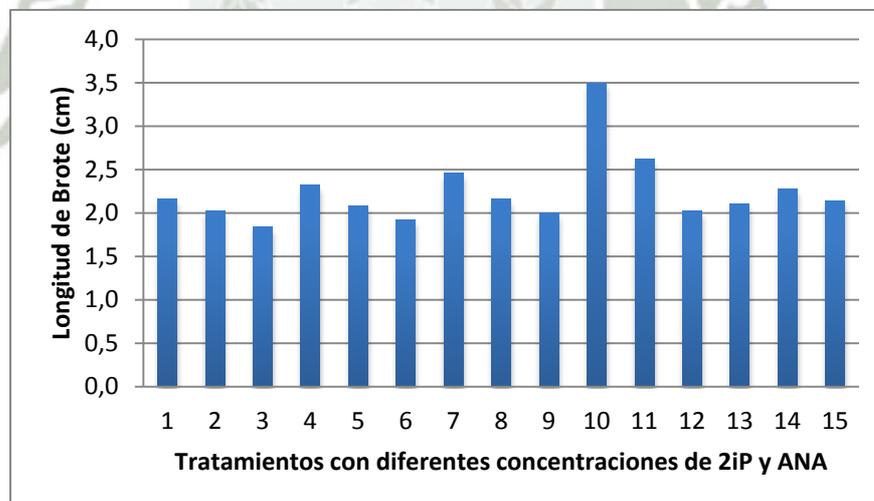
En la Figura N° 17 podemos observar el desarrollo de los explantes de arándano Misty a los 60 días del cultivo *in vitro*, con la concentración de 34.4 μM de 2-iP con 0 y 2.7 μM de ANA. Estos tratamientos mostraron los resultados de altura más sobresalientes, además mostraron vigorosidad.



Figura N° 17: *Explantos de arándano Misty a los 60 días de cultivo en medio WPM.*

En la Figura N° 18 observamos la comparación de la longitud promedio de los brotes para cada uno de los tratamientos realizados, podemos ver que el mejor resultado se obtuvo con el tratamiento 10 que corresponde a una concentración de 2-iP a $34.4\mu\text{M}$ y ANA a $0\mu\text{M}$.

Figura N° 18: *Comparación del efecto de citocinina (2-iP) y de auxina (ANA) en la altura promedio de los brotes en la fase de multiplicación in vitro.*



Podemos decir que las plántulas no necesitan de una auxina exógena para obtener una mayor altura, ya que en este caso la planta hace uso de la auxina natural presente en ella. En cuanto a los efectos fisiológicos de las auxinas, en su mayoría se observa que una concentración elevada produce un efecto inhibitorio, el cual podría deberse generalmente a un incremento en la producción de etileno (George, 2008).

Kryvenki, M. (2001) menciona que las auxinas tienen como efecto fisiológico principal el alargamiento celular actuando directamente en la inducción del ARNm, lo que origina un aumento de la plasticidad y de la extensión celular, así mismo actúa en la dominancia apical ejerciendo influencia en la yema principal sobre las laterales. Sin embargo en este caso sin la incorporación de este regulador de crecimiento obtenemos una mejor respuesta, debido probablemente a que concentraciones altas de auxinas provocan un efecto contrario al de alargamiento celular.

Hurtado, M. (1994) menciona que al agregar un auxina exógena a una planta que ya tiene a esta hormona presente en ella de forma natural, hace que la plántula suprima su crecimiento dando origen a la formación de callos, que darán lugar a la proliferación de células indiferenciadas, haciendo que la planta absorba los nutrientes y ponga toda su energía en la producción de callos, suprimiendo su alargamiento celular.

4.2.2 Análisis del Número de Hojas

Los resultados para la variable número de hojas obtenidos durante la etapa de multiplicación se muestran en la Tabla N° 9, la cual presenta los promedios del número de hojas para los 15 tratamientos de las diferentes combinaciones de 2-iP y ANA a los 60 días de realizada la siembra de los explantes en el medio de cultivo. Siendo el promedio de rangos entre 8 hojas/brote y 3.8 hojas/brote de los tratamientos: citocinina (2-iP) 34.4 μ M - auxina (ANA) 0 μ M y citocinina (2-iP) 44.3 μ M – auxina (ANA) 0 μ M; respectivamente.

Tabla N° 9:

Promedio en el número de hojas por brote de Vaccinium corymbosum L. variedad Misty desarrollada según tratamiento (concentración de 2-iP y ANA)

Tratamiento	2-iP (μM)	ANA (μM)	Numero de Hojas Promedio
1	0	0	5.0
2	0	2.7	5.4
3	0	5.4	5.1
4	14.8	0	5.2
5	14.8	2.7	5.6
6	14.8	5.4	5.2
7	24.6	0	5.4
8	24.6	2.7	7.0
9	24.6	5.4	6.0
10	34.4	0	8.0
11	34.4	2.7	7.6
12	34.4	5.4	7.2
13	44.3	0	5.6
14	44.3	2.7	3.8
15	44.3	5.4	4.0

Los grupos estadísticos obtenidos con el análisis de ANOVA, Apéndice N° 3, mostró que existe un gran número de tratamientos similares, que no tienen diferencia significativa, sin embargo, el tratamiento de 2-iP a 34.4 μM y ANA a 0 μM , tiene un grupo estadístico diferente a los demás, tal como se puede observar en la Tabla N°10.

Tabla N° 10:

Grupos estadísticos para el promedio en el número de hojas por brote de Vaccinium corymbosum L. variedad Misty desarrollada según tratamiento (concentración de 2-iP y ANA)

2ip μ M	ANA μ M		
	0	2.7	5.4
0	5.0 _{ef}	5.4 _{cdef}	5.1 _{ef}
14.8	5.2 _{def}	5.6 _{cdef}	5.2 _{def}
24.6	5.4 _{cdef}	7.0 _{abcd}	6.0 _{bcd}
34.4	8.0 _a	7.6 _{ab}	7.2 _{abc}
44.3	5.6 _{cdef}	3.8 _f	4.0 _f

De acuerdo con el análisis ANOVA, Apéndice N° 3, en el número de hojas por brote, podemos decir que existe una diferencia significativa al 95 % para el tratamiento 10 2-iP a 34.4 μ M y ANA a 0 μ M, con el cual se obtuvo el mayor número de hojas. También se observa que a medida que aumenta la concentración de ANA disminuye el número de hojas.

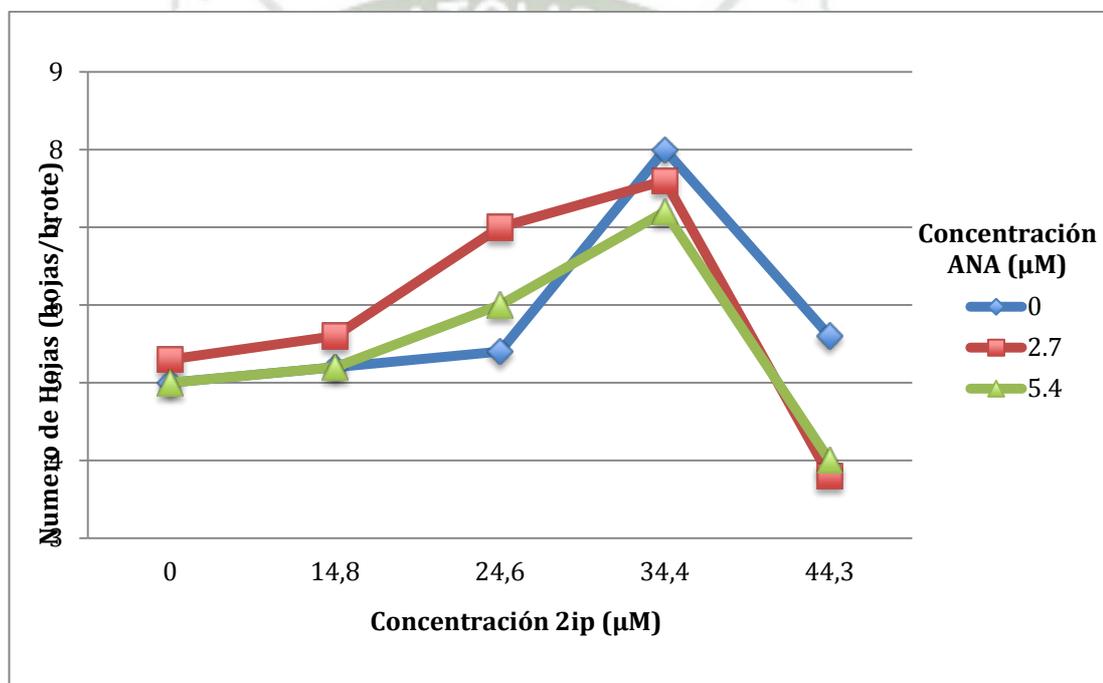
En cuanto al comportamiento de la auxina ANA al no incorporarla en el medio de cultivo obtenemos el mayor número de hojas por brote, lo que se observa en la Figura N° 19, ya que altas concentraciones de este regulador causa efectos negativos induciendo la formación de callos como menciona Hurtado (1994), esta respuesta depende de la concentración y el tipo de auxina utilizada, además al ser una auxina sintética no es regulada por la planta y se almacena hasta llegar a ser dañina.

En estudios preliminares se evaluó el efecto de la auxina ANA y su efecto con la citocinina BAP, sin embargo los explantes obtenidos en estos tratamientos mostraron aborto apical en varias de las concentraciones utilizadas, tal como se muestra en el apéndice N° 13. Por lo tanto se optó por utilizar 2ip en lugar de BAP como citocinina en el trabajo de investigación. Tal como lo sugiere Trujillo (2009), en donde probó 4.4, 13.3 y 22.2 μ M de BAP en el cultivo de *Vaccinium floribundum* kunth y encontró bajo crecimiento de yemas y eventualmente la muerte

de todo el explante. En el mismo trabajo se utilizó 14.8 y 24.6 μM de 2ip obteniendo elongación y buen estado de las plantas.

Por otro lado Ostrolucka *et al.* (2007) para *Vaccinium corymbosum* utilizaron el medio de cultivo Anderson para el desarrollo de explantes y reportaron que es factible obtener de 3 a 4 hojas por explante después de 6 semanas y 10,16 a 15,23 brotes de *Vaccinium corymbosum* en medio de cultivo Anderson suplementado con 2 μM de zeatina como citocinina.

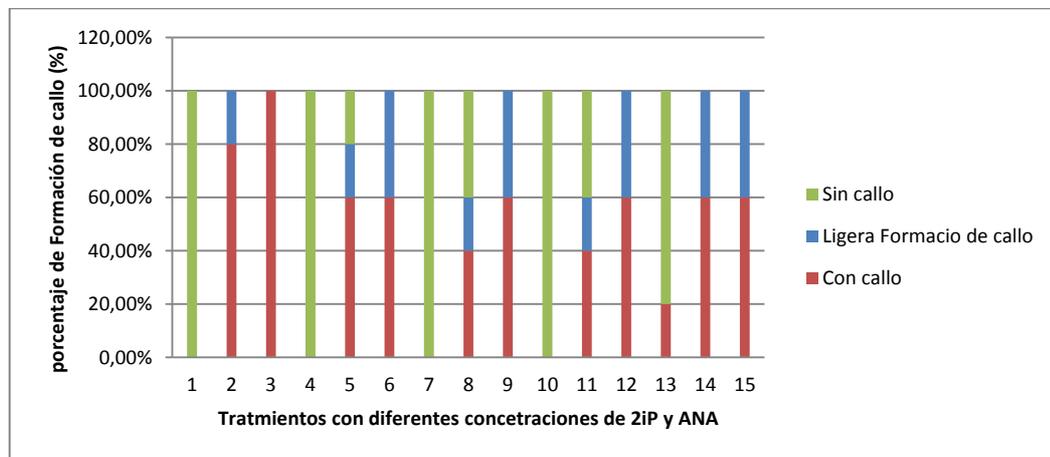
Figura N° 19: Efecto de la auxina (ANA) y citocinina (2-iP) en el promedio del número de hojas por brote en la fase de multiplicación *in vitro*.



4.2.3 Análisis en la Formación de callos

En la Figura N° 20 se muestran los porcentajes de formación de callos obtenidos en la experimentación. En los tratamientos 1, 4 y 10 no se observó la formación de callo, debido a la ausencia de la auxina ANA, lo que indica que no es necesario el uso de esta auxina para inducir el desarrollo de brotes. Según Roca W. (1991), es importante evitar la formación de callos en los explantes para fines de micropropagación, ya que esto trae como consecuencia la variabilidad fenotípica en los clones diferenciados.

Figura N° 20: *Porcentaje de plántulas con formación de callo para cada tratamiento (concentración de 2-iP y ANA).*



En el tratamiento 3 el cual tiene una concentración de ANA de $5.4\mu\text{M}$ y no contiene 2-iP se observa la mayor formación de callos (100%) tales como se observa en la Figura N° 21, debido a la acción de la auxina (ANA), la cual provoca la elongación de las células y estimula el desarrollo de la masa vegetal dando origen a la formación de callo (Taiz & Zeiger, 2006).



Figura N° 21: *Explante de arándano Misty con formación de callo*

Según Perik (1990) con una baja concentración de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con alta concentraciones de auxina no se producen raíces, y tiene lugar la formación de callos.

4.2.4 Análisis del coeficiente de multiplicación en la etapa de la multiplicación *in vitro*

El coeficiente de multiplicación se obtuvo a partir del número de yemas al inicio y al final de los tratamientos (Toro Cano, 2009).

$$\text{Coeficiente de multiplicación} = \frac{\text{Número de yemas finales}}{\text{Número de yemas iniciales}}$$

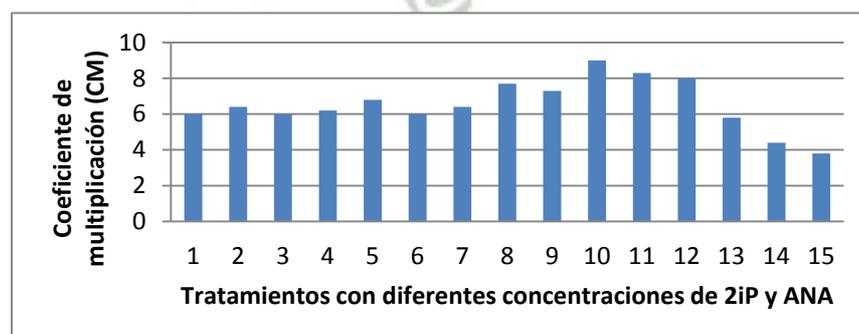
Tabla N° 11:

Coeficientes de multiplicación de los brotes de Vaccinium corymbosum L. variedad Misty desarrollada según tratamiento (concentración de 2-iP y ANA) a los 60 días de cultivo.

2-iP (μM)	ANA (μM)		
	0	2.7	5.4
0	6 ± 2.4	6.4 ± 1.7	6 ± 2.1
14.8	6.2 ± 2.8	6.8 ± 1.3	6 ± 2.4
24.6	6.4 ± 2.9	7.7 ± 1.7	7.3 ± 1.3
34.4	9 ± 3.3	8.3 ± 2.8	8 ± 2.9
44.3	5.8 ± 3.1	4.4 ± 1.5	3.8 ± 1.8

En la Tabla N° 11 se presentan los coeficientes de multiplicación obtenidos para los diferentes tratamientos de citosina (2-iP) y Auxina (ANA) a los 60 días de cultivo de los brotes de *Vaccinium corymbosum* L. de la variedad Misty. Se determinó que el mejor tratamiento fue el de 34.4μM de 2-iP con 0 μMde ANA con el cual se obtuvo una tasa de multiplicación de 9.

Figura N° 22: *Comparación de los coeficientes de multiplicación (número de yemas final/ número de yemas inicial) obtenidos con diferentes concentraciones de 2-iP y ANA a los 60 días de cultivo.*

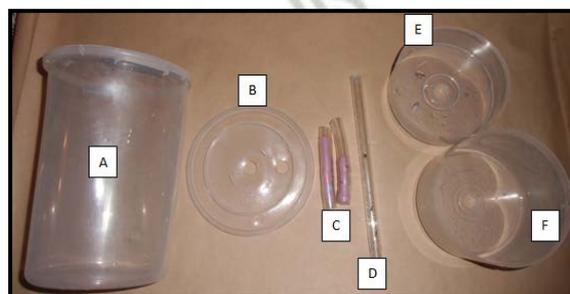


En la Figura N° 22 se realiza una comparación entre los tratamientos de los reguladores de crecimiento 2-iP y ANA a diferentes concentraciones, donde se observa que los tratamientos con mayores valores para el coeficiente de multiplicación fueron los tratamientos 8, 9, 10, 11 y 12. Resaltando el tratamiento 10 que como se mencionó anteriormente obtuvo el coeficiente de multiplicación más elevado 9.

4.3 Diseño y construcción del reactor de inmersión temporal.

El reactor de inmersión temporal diseñado en el presente trabajo de investigación está basado en el sistema RITA ® (CIRAD, Francia). El reactor consta de varias partes tal como se muestra en la Figura N° 23. Está conformado por un recipiente principal de 3L, el cual contiene al resto de materiales y al medio de cultivo líquido. Filtros de espuma en la entrada y salida para asegurar la esterilidad del proceso similares a los utilizados por Martín Tejada (2010), un tubo de vidrio central cuyo objetivo es llevar el aire bombeado hasta el fondo del reactor para activar el sistema neumático del reactor, tal como se muestra en el Apéndice N° 14. El recipiente de cultivo que es el lugar donde se colocan los explantes posee orificios en la base que permiten el ingreso y la salida del medio de cultivo con facilidad. Los recipientes pueden ser armados y desarmados sin dificultad, facilitando su limpieza. Es importante que este sistema sea totalmente hermético ya que de otra manera, existiría riesgo de contaminación y se perdería la potencia de la bomba.

Figura N° 23: *Partes del reactor de inmersión temporal. A) recipiente principal. B) Tapa. C) Filtros de espuma. D) Tubo central. E) Recipiente inferior. F) Recipiente de cultivo.*



4.3.1 Funcionamiento del reactor

En el presente trabajo de investigación se pusieron en funcionamiento los nueve reactores de inmersión temporal simultáneamente, tal como se muestra en la Figura N° 24, donde cada uno conto con su propio temporizador, programado a su respectivo tiempo y frecuencia de inmersión, según el tratamiento a investigar. De forma preliminar se utilizaron filtros de aire marca INTERSURGICAL, dichos filtros no funcionaron adecuadamente en la experimentación ya que a los siete días de inoculadas las plantas, la mayoría de los reactores mostraban contaminación. Por lo cual, se optó por utilizar filtros de espuma introducidos a presión, tal como se muestra en la Figura N° 25. Dicho procedimiento es similar a lo experimentado por Martin Tejada en el 2010.



Figura N° 24: *Funcionamiento simultaneo de nueve reactores de inmersión temporal con sus respectivos temporizadores y bombas de aire.*



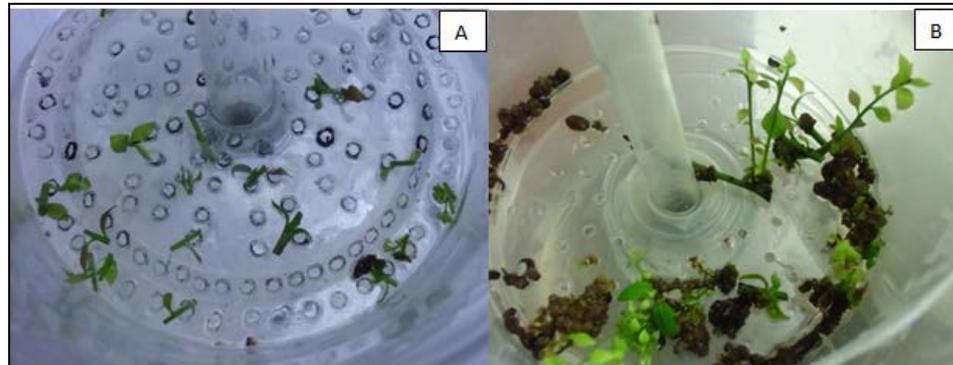
Figura N° 25: *Diferencia entre los filtros de espuma introducidos a presión y los filtros para ventilador de hospital marca INTERSURGICAL*

El ingreso de aire hacia la cámara inferior del reactor se realizó mediante el uso de una bomba de aire de 2 W de potencia, la cual bombea hasta 3 L/min. El aire, tanto de entrada como de salida fue filtrado con espuma introducida a presión, garantizando la esterilidad del reactor. El reactor tenía 500 mL de medio líquido, alcanzando una altura de 4 cm y de 7 cm en estado de inmersión. La inmersión se alcanzaba a los 30 segundos después de activada la bomba. Cada reactor de inmersión temporal contó con su propio temporizador lo cual facilitó la investigación, al momento de analizar diferentes tiempos de inmersión y frecuencias de inmersión al mismo tiempo.

4.3.2 Evaluación de la frecuencia y el tiempo de inmersión

Dentro de cada reactor se colocaron 15 explantes, los cuales fueron segmentos nodales de *Vaccinium corymbosum* L. variedad Misty provenientes de la etapa de multiplicación, tal como se puede observar en la Figura N° 26A.

Figura N° 26: *Desarrollo de explantes de arándano en el reactor de inmersión temporal. A) Inicio del cultivo. B) Fin del cultivo 60 días.*



En la Figura N° 26B se observa el desarrollo de los explantes de *Vaccinium corymbosum* L. variedad Misty a los 60 días de cultivo en medio líquido WPM

En esta etapa se comparó combinaciones entre 3 tiempos de inmersión; 1, 3, y 6 minutos y 3 frecuencias de inmersión; 4, 6 y 8 inmersiones al día.

Para cada tratamiento se analizó dos variables, la altura alcanzada por los explantes y el número de hojas desarrolladas, la altura fue registrada con la ayuda de papel milimetrado como se muestra en la Figura N° 27.



Figura N° 27: *Explantes de arándano al finalizar el cultivo en los reactores de inmersión temporal.*

4.3.3 Evaluación de la altura promedio de los explantes desarrollados en los Reactores de Inmersión Temporal

Para el análisis de la altura de los explantes se tomó en cuenta los promedios de cada uno de los tratamientos. Se analizó las frecuencias de inmersión de 2, 4 y 8 veces al día, y los tiempos de inmersión de 1, 3 y 6 minutos a los 60 días de cultivo, lo que resultó en 9 tratamientos diferentes (Tabla N° 12).

Dentro de los tratamientos se determinó cual fue el mejor de las combinaciones de los tiempos de inmersión y frecuencia de inmersión, donde se muestra que el valor más alto fue de 6.2 cm con un tiempo de inmersión de 1 min y una frecuencia de 4 inmersiones al día (una inmersión cada 6 horas). Mientras que el menor valor fue obtenido por un tiempo de Inmersión de 6 min y una frecuencia de 8 inmersiones al día con una altura promedio de 3.7 cm.

Los explantes del tratamiento con un tiempo de inmersión de 1 min y una frecuencia de 4 inmersiones al día obtuvieron los resultados más altos, ya que mantuvieron un contacto con el medio líquido equilibrado, sin ser exagerado como para llegar a la hiperhidricidad, ni tampoco escaso como para que el explante no se desarrolle (Etienne, 2002).

Tabla N° 12:

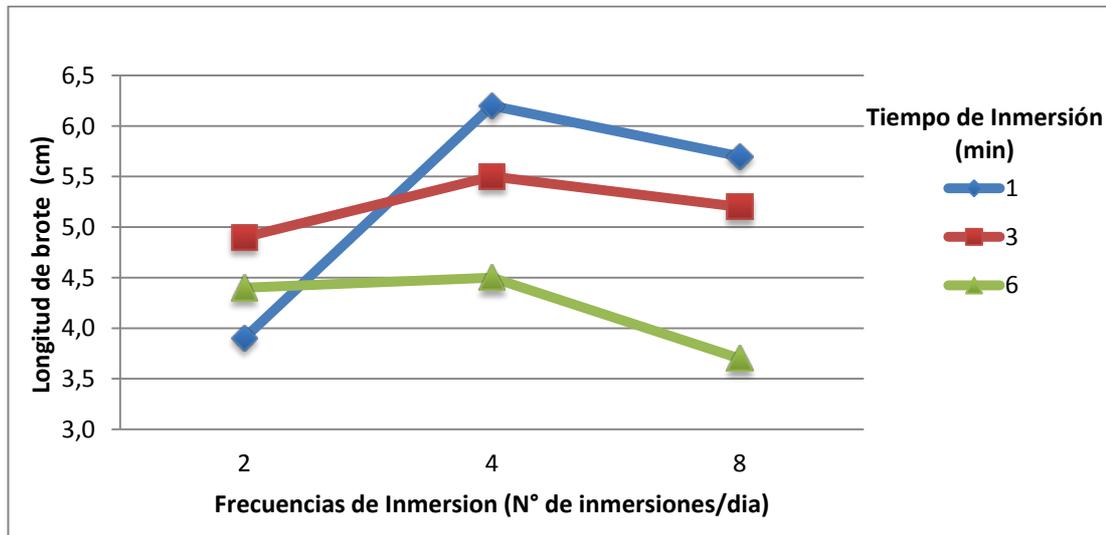
Promedio de la altura de los explantes de acuerdo al tiempo y la frecuencia de inmersión.

Tiempo de Inmersión (min)	Frecuencia de Inmersiones (N° de inmersiones/día)		
	2	4	8
1	3.87 _{ef}	6.17 _a	5.71 _{ab}
3	4.85 _c	5.53 _b	5.22 _{bc}
6	4.36 _{de}	4.49 _d	3.69 _f

Según el análisis ANOVA, Apéndice 4, se demuestra que existe diferencia significativa en un 95 % entre los tratamientos, obteniendo diferentes grupos estadísticos, tal como se muestra en la tabla N° 12, el tratamiento con el valor

más alto es el de 1 min de inmersión 4 veces al día, mostrando un grupo estadístico diferente a los demás tratamientos. Y como se observa en la Figura N° 28.

Figura N° 28: *Evaluación de cada uno de los tiempos de inmersión con respecto a las frecuencias de inmersión para la altura de los explantes.*



En la Figura N° 28 se observa la comparación entre los diferentes tiempos de inmersión con respecto a las frecuencias de inmersión, donde se muestra que los explantes que tuvieron el menor desarrollo fueron los sometidos a un tiempo de inmersión de 6 minutos con una frecuencia de inmersión de 8 inmersiones al día (cada 4 horas), lo cual produjo un exceso de contacto del explante con el medio líquido, por lo tanto pudo provocar hiperhidricidad en los explantes, afectando su desarrollo.

Por otra parte el mayor valor fue obtenido con un tiempo de inmersión de 1 minuto con una frecuencia de 4 inmersiones al día (cada 8 horas), debido a que el explante se sometió a un equilibrio entre ambas variables, frecuencia de inmersión y tiempo de inmersión.

4.3.4 Evaluación del promedio en el número de hojas desarrolladas en los Reactores de Inmersión Temporal

Otro de los factores que se analizó en los reactores de inmersión temporal fue el número de hojas desarrolladas en cada uno de los tratamientos realizados. Tal

como se muestra en el Tabla N° 13. Que al relacionar Tiempo de inmersión con el número de inmersiones por día, se observa que, el tratamiento que obtuvo los resultados más elevados fue un tiempo de inmersión de 1 min con 8 inmersiones al día y con un promedio de 14.2 hojas. Mientras que el menor valor fue el que se obtuvo con un tiempo de inmersión de 6 min con 4 inmersiones diarias, con un promedio de 10.7 hojas.

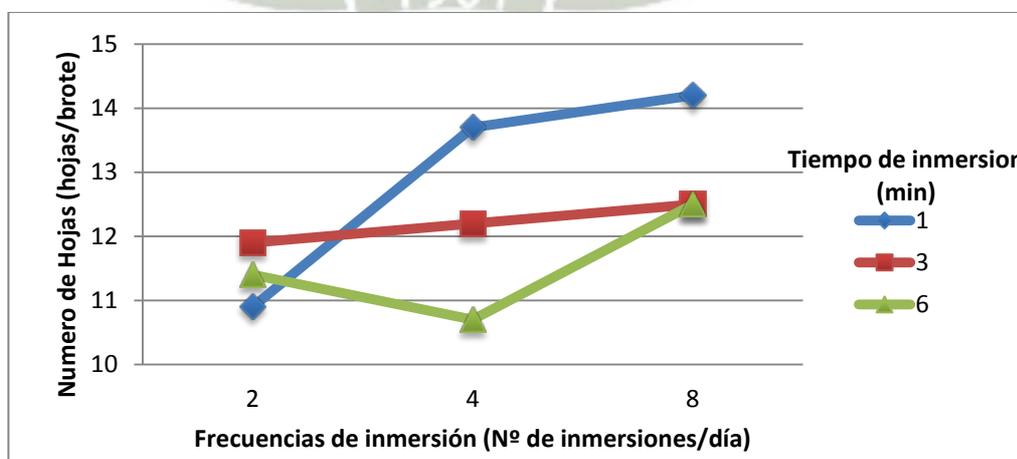
Tabla N° 13:

Promedio del número de hojas de los explantes de acuerdo al tiempo y la frecuencia de inmersión.

Tiempo de Inmersión (min)	Frecuencia de inmersiones (N° de inmersiones/día)		
	2	4	8
1	10.87 _{de}	13.73 _{ab}	14.20 _a
3	11.87 _{cde}	12.20 _{cd}	12.47 _{bc}
6	11.40 _{cde}	10.73 _e	12.47 _{bc}

Según el análisis de ANOVA del número de hojas desarrolladas, Apéndice N° 5, podemos decir que existe diferencia significativa entre cada uno de los tratamientos y que presentan diferentes grupos estadísticos, tal como se observa en la Tabla N° 13, donde el tratamiento con los valores más elevados fue el de 1 minuto de inmersión 8 veces al día. Obteniendo también un grupo estadístico diferente a los demás con un nivel de significancia al 95%.

Figura N° 29: *Evaluación de cada uno de los tiempos de inmersión con respecto a las frecuencias de inmersión para el número de hojas de los explantes.*



De los resultados obtenidos podemos decir que la frecuencia de inmersión de 4 veces a los días es la única que presenta una disminución en el promedio del número de hojas tanto para el tiempo de inmersión de 3 min como para el tiempo de inmersión de 6 min. En el caso de la frecuencia de inmersión de 8 veces al día, el número de hojas disminuyó en el tiempo de inmersión de 3 min pero luego se mantuvo el valor para el tiempo de inmersión de 6 min y para la frecuencia de inmersión de 8 veces al día hubo un incremento y luego una disminución en los tiempos de inmersión de 3 y 6 min. respectivamente. Los valores más altos en el número de hojas desarrolladas para cada una de las frecuencias de inmersión fueron en el tiempo de inmersión de 1 min excepto para la frecuencia de inmersión de 2 veces al día. Tomando en cuenta que el rango del promedio de número de hojas está entre 10.73 y 14.2, casi no existe mucha diferencia en el promedio del número de hojas, como se observa en el Apéndice N° 5, existen varios grupos estadísticos similares, por lo tanto el tiempo y frecuencia de inmersión afecta más a la altura de los explantes y sus propiedades físicas, que al número de hojas.

4.3.5 Coeficientes de multiplicación en el reactor de inmersión temporal

De la misma forma que en la etapa *in vitro* se calculó el coeficiente de multiplicación obtenido en la etapa de propagación en reactores de inmersión temporal. Posteriormente se comparará el coeficiente de multiplicación en ambas etapas de la propagación, para determinar en qué medida los reactores de inmersión temporal aumentaron la eficiencia de producción de yemas (Tejada, 2010).

Tabla N° 14:

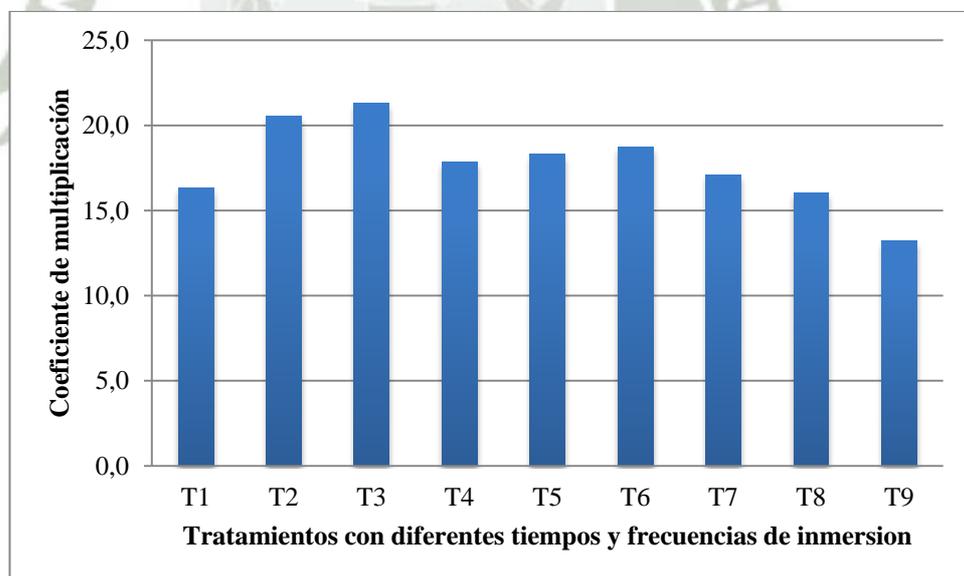
Coeficientes de multiplicación en los explantes de acuerdo al tiempo y la frecuencia de inmersión.

Tiempo de Inmersión (min)	Frecuencia de Inmersión (N° de inmersiones/día)		
	2	4	8
1	16.4± 2.1	20.6± 2.0	21.3± 1.4
3	17.9± 2.1	18.3± 2.0	18.8± 1.8
6	17.1± 1.8	16.1± 1.5	13.2± 2.3

En la Tabla N° 14 se muestran los promedios de los coeficientes de multiplicación para cada tratamiento, combinando los tiempos de inmersión con las frecuencias de inmersión, donde se observa que el tratamiento que presenta los resultados más elevados es el que tiene un tiempo de inmersión de 1 minuto con una frecuencia de 8 veces al día (cada 4 horas), con un coeficiente de multiplicación de 21.3. Mientras que el menor valor obtenido lo presentó el tiempo de inmersión de 6 minutos con una frecuencia de inmersión de 8 veces al día (cada 4 horas), con un coeficiente de multiplicación de 13.2.

En la Figura N° 30 se muestran los resultados de los 9 tratamientos utilizados en la fase de propagación en reactores de inmersión temporal, donde se muestran los coeficientes de multiplicación, destacando los tratamientos 2 y 3 que fueron los que obtuvieron los valores más altos.

Figura N° 30: *Comparación de los coeficientes de multiplicación (número de yemas final/ número de yemas inicial) obtenidos con diferentes tiempos de inmersión y diferentes frecuencias de inmersión.*



Según Takayama (1994) el uso de un medio líquido, permite un mejor contacto entre los explantes con nutrientes y el agua, por lo que aumenta su disponibilidad y se facilita su difusión, produciendo además de un incremento del vigor y biomasa de los

brotos. Este sistema permite un mejor desarrollo general del explante en un menor tiempo.

4.4 Enraizamiento *in vitro*

En esta etapa se evaluó el efecto de la auxina ANA (Ácido naftalen acético) a concentraciones de 10.7, 16.1, 21.5, 26.9y 32.2 μ M en el enraizamiento *in vitro* de Arándano de la variedad Misty en medio solido WPM.

A los 30 días se realizó la evaluación de los resultados y se encontró la formación de callos para los tratamientos 1, 2, 3 y 4 además de la pérdida de hojas y necrosis de las plántulas mientras que con el tratamiento 5 se produjo la muerte de la planta y una leve formación de callo lo cual se muestra el a Figura N° 31, estos resultados pueden estar debidos a que cuando se utiliza concentraciones muy elevadas de auxina para el enraizamiento *in vitro* se produce la inducción de callos así como la muerte de la plántula por toxicidad Marcotrigiano&McGlew (1991).

Estos resultados difieren de los obtenidos por Ostrolucká et al. (2007) quienes cuantificaron 80-95% de enraizamiento *in vitro* en medio AND suplementado con 0.8 mg/L de AIB y 0.8 g/L de carbón activado.EL medio de cultivo, el tipo de auxina utilizada y el carbón activado influyeron en la formación de raíces.

Figura N° 31: *Plántulas de arándano con necrosis y formación de callos*



T1

T2

T3.

T4

T5

Por otro lado existen trabajos de enraizamiento *ex vitro* de *Vaccinium corymbosum*, es el caso de Jaakola et al. (2001) quienes obtuvieron de 80-90% de plantas enraizadas en cubetas con turba y perlita 2:1(v/v) sin la presencia de reguladores de crecimiento.



CONCLUSIONES

1. El tratamiento más adecuado de desinfestación de los explantes de *Vaccinium corymbosum* L. de la variedad Misty, durante su establecimiento *in vitro* libre de contaminantes superficiales, fue a 0.12 % (v/v) de hipoclorito de sodio durante 5 minutos logrando un promedio de 83.33 % de explantes viables.
2. La concentración de 34.4 μM de 2-iP (2 isopentenilaminopurina) en ausencia de ANA produjo la mayor altura (3.5 cm) y el número de hojas (8 hojas/brote) en los brotes de *Vaccinium corymbosum* L. variedad Misty a los 60 días de cultivo en medio sólido WPM.
3. Se diseñó un reactor en base al modelo RITA®, utilizando un sistema de agitación neumática impulsado con bombas de 2 W, alcanzando un flujo de 3L/min de aire, el cual fue estéril por los filtros de esponja. Con un tiempo de llenado de la cámara inferior de 30 segundos que funcionaron con 500 mL de volumen, ocupando 4 cm de altura en el volumen del reactor y 7 cm de altura en estado de inmersión.
4. En los reactores de inmersión temporal se determinó que con un tiempo de inmersión de 1 minuto por 4 veces al día se obtuvieron los valores más altos para la longitud de los brotes (6.2 cm), mientras que para el tratamiento de 8 inmersiones al día durante 1 minuto se obtuvo el mayor número de hojas (14.2 hojas/brote) y coeficiente de multiplicación (21.3).
5. Para las concentraciones de 10.7, 16.1, 21.5, 26.9 y 32.2 μM de Auxina (ANA) evaluadas, en la inducción del enraizamiento se obtuvo como resultado la formación de callos y la muerte de los microtallos.

RECOMENDACIONES

- Utilizar diferentes citocininas como Zeatina, y Thidiazuron. Y también usar diferentes auxinas como IBA para aumentar la tasa de multiplicación.
- Evaluar la eficiencia en la propagación de arándano en otro tipo de reactores de inmersión, como el reactor de inmersión por gravedad o los reactores Twin flasks.
- Evaluar el efecto de la concentración de la fuente de carbono en el medio de cultivo utilizado para la multiplicación de arándano.
- Evaluar otros reguladores de crecimiento como IBA, AIA, AIP en el enraizamiento de microtallos de *Vaccinium corymbosum L.*, variedad Misty.
- Realizar un estudio de factibilidad para el protocolo desarrollado en el presente trabajo de investigación.

REFERENCIAS

- 1 Agrovit. (2002). From http://26.agrobit.com/Info_tecnica/
- 2 *Alimentación Sana*. (17 de Febrero de 1992). Retrieved 20 de Junio de 2013 from Alimentacion Sana Web site: <http://www.alimentacion-sana.com>
- 3 Benavides, L. (2011). Estudio de prefactibilidad para la producción y comercialización de Arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) en condiciones de valles andinos. Lima.
- 4 Berthouly, M., & Etienne, H. (2005). *Liquid Systems for in vitro plant propagation*. Pay-Bas: Springer.
- 5 Buzeta A. (1997). *Berries para el 2000*. Fundación Chile. Santiago.
- 6 Cabrera Jora, M., GomezKosky, R., & Espinosa Cuellar, E. (2011). *Effect of liquid media culture system on yam plant growth (Dioscoreaalata L. "PacalaDuclos")*. Santo Domingo: INIVIT.
- 7 Carrera, J. (2012). *Manual práctico para la creación y desarrollo de plantaciones de arándano en Asturias*. Asturias.
- 8 Cassells, A. (1991). *Problems in tissue culture*. Dordrecht: Ed. H. DPCyZR Kluwer Academic.
- 9 Choi, Y., Kim, Y., & Paek, K. (2006). Plant tissue culture engineering. *Biotechnol. Prog* , 11, 429–435.
- 10 CIAT. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Cali: Roca, WM y Mroginski.
- 11 Cifuentes, M. R. (2010). *Efecto de la aplicacion de CPPU sobre calidad de fruta en arandano alto (Vaccinium corymbosum L.) cultivar Elliott*. Temachuco.
- 12 Clavell, L., & Pedrique, M. (1992). *Manual de Métodsa Generales* (segunda ed.). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

- 13 Cronquist, A. (1981). *An integrated system of clasification of flowering plants*.US: UniversityPress.
- 14 CutzTax, A. J. (2004). *Micropropagación de Tres Variedades de Arándano (Vaccinium ashei Readel)*. Guatemala.
- 15 Davey, M., & Anthony, P. (2010). *Plant Cell Culture*.West Sussex: Oxford.
- 16 Debergh, P., & Read, P. (1991). *Micropropagation*. Dordrecht: Ed. H. DPCyZR Kluwer Academic.
- 17 Espinosa, A. (2008). *Multiplicación In Vitro de Cúrcuma*. Granma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal.
- 18 Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). *Temporary immersion systems in plant micropropagation*.Montpellier: Centre de cooperation Internationale en Recherche Agronomique pur le Development-cultures.
- 19 FAO/IAEA. (2004). Low cost options for tissue culture technology in developing countries. *Proceedings of a Technical Meeting organizaed by Joint Division of Nuclear Techniques in Food and Agricultural in Vienna*.Vienna.
- 20 Fowler, M., & Warren, G. (1988). *Plant Biotechnology*.New York: PergamonPress.
- 21 Gámez Bastén, M. (2002). *Arándanos*. Oficina de estudios y politicas agrarias de Chile.
- 22 Garcia, & Gonzales. (2011). *El cultivo del Arándano en Asturias.*, (p. 7). Asturias.
- 23 Garcia, G., & Rubio, J. (2005). *El Cultivo de Arándanos en Asturias*. Asturias: SERIDA.
- 24 George, E. (1996). *Problems in initiating and maintaining cultures*.Wilts: Ed. Exegenetics Ltd.

- 25 Hancock, & Draper. (1989). Blueberry culture in North America. *Hort. Science* , 551-556.
- 26 Hirzel, J., & Rodríguez, N. (2003). *Acidificación de suelos para plantación de arándanos*. Chillán: Informativo Agropecuario - INIA.
- 27 Hurtado, D. (1994). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Mexico DF: TRILLAS.
- 28 Infoagro. (2013). From http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/arandano.htm
- 29 Kim, Y., Weathers, P., & Wyslouzil, B. (2002). Growth of *Artemisia annua* hairy roots in liquid- and gas-phase reactors. *Biotechnol. Bioeng.* , 80, 454-464.
- 30 Konar, R. (1973). *Interaction of CCC and gibberic acid in the morphogenesis of Ranunculus sceleratus tissue in vitro*. *Phytomorph.*
- 31 Marcotrigiano, M., & McGlew, S. (1991). *A Two-stage Micropropagation System for Cranberries*. Amherst: Department of plant and soil Sciences.
- 32 Ostrolucká, M., Gajdosova, A., Liviakova, G., Hruvicoka, K., Beso. (2007). Protocol for micropropagation of selected *Vaccinium* spp. Dordrecht. Springer. Pp. 445-455.
- 33 Panda et Al. (1989). *Enz. Microb. Technol.* , 11, 386 -397.
- 34 Payne, G., Bringl, V., Prince, C., & Shuler, M. (1991). *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. Munich: Hanser Publishers.
- 35 Perú Berries, P. P. (2012). *Haciendo realidad un Sueño Inclusivo*. Lima: Sierra Exportadora.
- 36 Pintos, P. (2001). *Regeneración y primeras etapas del proceso de transformación genética en geranio*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.

- 37 Rache, Y., & Pacheco, J. (2010). Propagación in vitro de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). *Acta Botánica de Brasil* , 1086-1095.
- 38 *Red agrícola*. (2013). Retrieved 7 de Febrero de 2013 from <http://www.redagricola.com/reportajes/frutales/arandanos-en-peru-situacion-actual-y-perspectivas>
- 39 *Redagricola*. (2012). Retrieved 15 de Noviembre de 2013 from <http://www.redagricola.com/reportajes/frutales/arandanos-en-peru-situacion-actual-y-perspectivas>
- 40 Reuther, G. (1998). *Comparative anatomical and physiological studies with ornamental plants under in vitro and greenhouse conditions*. *Acta Horticulturae*.
- 41 RodríguezBerault, M. (2010). *Propagación de arándanos*. Escuel de Agronomía , Universidad Cáolica de Temuco.
- 42 Rodríguez, M. (2012). *Prropagación de Arándanos*. Temuco: Escuela de Agronomía, Universidad de Temuco.
- 43 Rosell, C., & Villalobos, V. (1990). Fundamento teórico-práctico del cultivo de tejidos vegetales. In FAO. Roma.
- 44 Saifuddin, M., Hossain, A., Normaniza, O., Nasrulhaq Boyce, A., & Moneruzzaman, K. (2009). *The Effects of Naphthalenacetic Acid and Giberellic Acid in Prolonging Bract Longevity and Delaying Discoloration of Bougainvillea spectabilis*. Malaya: Asiannetworkforscientificinformation .
- 45 Schroeder, C., & Spector. (1957). *Efect of Giberelic Acid and indolacetic acid in growth of excised fruti tissue*. *Science*.
- 46 Steward F, A. P. (1970). *Growth and developement of totipotent cells, some problems, procedures and perspectives*.
- 47 Strick, B., & Hart, J. (1997). *Fertilizer Guide: Blueberries*. Oregon: OregonStateUniversity.

- 48 Swartz, H. (1991). *Post culture behavior: genetic and epigenetic effects and related problems*. Dordrecht: Ed. H. DPCyZRKluwerAcademic.
- 49 Taiz, L., & Zeiger, e. (2006). *Fisiología Vegetal* (3 ed.). Sunderland: SinauserAssociates.
- 50 Tanaka, H., Suwa, M., & Iwanoto, T. (1983). Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng* , 25, 2359–2370.
- 51 Tejada, M., (2010). Diseño de un sistema de Inmersión Temporal con tres frecuencias en la multiplicación In Vitro de dos especies de oregano (*Origanum x Majoricum* y *Origanum Majorana*) de la region Arequipa, Universidad Católica de Santa María.
- 52 Titze, Hitchcock, & Broadhead. (2004). *J. Biomech.* , 37, 1521–1529.
- 53 Toro Cano, M. A. (2009). *MEJORAMIENTO DEL PROCESO DE PROPAGACIÓN IN VITRO DE PLANTAS DE ARÁNDANO PARA LAS VARIETADES BLUECROP, DUKE Y MISTY.* . Santiago: Universidad de Chile.
- 54 Trujillo, D. (2009). Establecimiento del cultivo In Vitro de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) a partir de yemas axilares. Quito. Universidad de San Francisco.
- 55 USDA, D. d. (2011). *Arándanos: Tendencias recientes en la Industria en EE.UU.* Washington DC.: USDA.
- 56 Usui K. et al. (1996). Principios básicos del cultivo de tejidos. *ICTA / JOCV.*, (p. 166). Guatemala.
- 57 Villalobos, V., & Thorpe, T. (1993). Principios Básicos, Metodologías y Técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales. In W. Roca, & L. Mroginski, *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. Cali.
- 58 Vuylsteke, D. (1989). Shoot–tip culture for propagation, conservation and exchange of *Musa.*, (p. 56). Roma.

- 59 Wagner, F., & Vogelmann, H. (1977). *Plant Tissue and its Biotechnological Application* , 245 – 252.
- 60 Weathers, P., & Zobel, R. (1992). Aeroponics for the culture of organisms, tissues and cells. *Biotechnol. Adv* , 10, 93–115.



APENDICES

Apéndice N° 1: Composición del Medio Lloyd McCown de 1980.

Macronutrientes(A)	Fórmula	WPM	stock 10 x (1000 ml)
	química	mg/L	mg/L
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	400	4000
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	96	960
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	3700
Fosfato monobásico de potasio	KH_2PO_4	170	1700
Sulfato de potasio	K_2SO_4	990	9900
Nitrato de calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	556	5560
Micronutrientes(B)			stock 20X (200ml)
			mg/L
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	446
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	172
Ácido bórico	H_3BO_3	6.2	124
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	5
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25	5
FeEDTA (C)			stock 20X (200 ml)
			mg/L
Ácido etilenediominatetraacético	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3	746
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	556
Vitaminas (D)			stock 50X (100 ml)
			mg/L
Ácido ascórbico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	2.0	100
Glicina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	2.0	100
Acido nicotínico	$\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_2$	0.5	25
Piridoxina.HCl		0.5	25
Tiamina. HCl		0.1	5
Mio-inositol (E)			stock 10X (100 ml)
			mg/L
		100	1000

Apéndice N° 2: Análisis de Varianza para la Altura de los brotes en la fase de multiplicación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano)

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: VR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	14	11.20586667	0.80041905	5.03	<.0001
Error	60	9.54000000	0.15900000		
Corrected Total	74	20.74586667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VR Mean
0.540149	17.75897	0.398748	2.245333

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRA	14	11.20586667	0.80041905	5.03	<.0001

The SAS System 19:37 Friday, November 24, 2000 3

Tratamiento	Promedios de altura (cm)	Grupos de DUNCAN
T10	3.5	A
T11	2.62	B
T7	2.46	B
T4	2.32	BC
T14	2.28	BC
T8	2.16	BC
T1	2.17	BC
T15	2.14	BC
T13	2.10	BC
T5	2.08	BC
T2	2.06	BC
T12	2.02	C
T9	2.0	C
T6	1.92	C
T3	1.86	C

Apéndice N° 3: Análisis de Varianza para el número de hojas de los brotes en la fase de multiplicación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano)

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: VR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	14	105.4666667	7.5333333	4.75	<.0001
Error	60	95.2000000	1.5866667		
Corrected Total	74	200.6666667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VR Mean
0.525581	21.97028	1.259630	5.733333

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRA	14	105.4666667	7.5333333	4.75	<.0001

The SAS System 19:37 Friday, November 24, 2000 7

Tratamiento	Promedio de numero de hojas	Grupo de DUNCAN
T10	8	A
T11	7.6	AB
T12	7.2	ABC
T8	7.0	ABCD
T9	6.0	BCD
T13	5.6	CDEF
T5	5.6	CDEF
T2	5.4	CDEF
T7	5.4	CDEF
T4	5.2	DEF
T6	5.2	DEF
T1	5.0	EF
T3	5.1	EF
T15	4.0	F
T14	3.8	F

Apéndice N° 4: Análisis de Varianza para la Altura de los brotes en la fase de multiplicación en reactores de inmersión temporal de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano)

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: VR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	86.7934815	10.8491852	18.14	<.0001
Error	126	75.3653333	0.5981376		
Corrected Total	134	162.1588148			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VR Mean
0.535238	15.85786	0.773394	4.877037

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRA	8	86.79348148	10.84918519	18.14	<.0001

The SAS System
19:37 Friday, November 24, 2000 15

Tratamiento	Promedio de altura (cm)	Grupo de DUNCAN
T2	6.17	A
T3	5.71	AB
T5	5.53	B
T6	5.22	BC
T4	4.85	C
T8	4.49	D
T7	4.36	DE
T1	3.87	EF
T9	3.69	F

Apéndice N° 5: Análisis de Varianza para el numero de hojas de los brotes en la fase de multiplicación en reactores de inmersión temporal de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano)

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: VR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	167.5703704	20.9462963	7.27	<.0001
Error	126	363.2000000	2.8825397		
Corrected Total	134	530.7703704			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VR Mean
0.315712	13.89955	1.697804	12.21481

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRA	8	167.5703704	20.9462963	7.27	<.0001

The SAS System 19:37 Friday, November 24, 2000 19

Tratamiento	Promedio de numero de hojas	Grupo de DUNCAN
T3	14.2	A
T2	13.73	AB
T9	12.47	BC
T6	12.47	BC
T5	12.2	CD
T4	11.87	CDE
T7	11.4	CDE
T1	10.87	DE
T8	10.73	E

Apéndice N° 6: Valores y promedios de la altura obtenida *invitro* de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano)

Citocinina 2-iP (μM)	Explante	Auxina ANA (μM)		
		0	5.4	10.7
0	1	2.3	1.9	1.9
	2	2.0	2.3	1.7
	3	2.4	2.1	1.8
	4	2.2	1.9	1.8
	5	1.9	2.1	2.1
	x	2.2	2.0	1.8
14.8	1	2.1	2.1	1.9
	2	2.5	2.3	1.7
	3	2.3	2.0	2.1
	4	2.4	1.9	2.2
	5	2.3	2.1	1.7
	x	2.3	2.1	1.9
24.6	1	2.8	2.5	2.2
	2	1.5	2.3	2.3
	3	2.4	1.9	1.7
	4	2.5	2.3	1.8
	5	3.1	1.8	2.0
	x	2.5	2.2	2.0
34.4	1	1.9	2.6	2.1
	2	4.1	2.8	1.6
	3	3.8	2.7	2.1
	4	4.2	2.4	2.5
	5	3.5	2.6	1.8
	x	3.5	2.6	2.0
44.3	1	1.6	2.1	2.4
	2	2.8	2.5	1.9
	3	2.2	2.4	2.4
	4	2.1	1.5	1.5
	5	1.8	2.9	2.5
	x	2.1	2.3	2.1

Apéndice N° 7: Valores y promedios del número de hojas obtenidos *invitro* de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano)

2-iP μ M	Explante	ANA μ M		
		0	5.4	10.7
0	1	6	6	6
	2	4	5	5
	3	5	4	3
	4	4	5	6
	5	6	7	5
	x	5.0	5.3	5.0
14.8	1	6	7	7
	2	5	8	5
	3	4	4	3
	4	5	6	7
	5	6	3	4
	x	5.2	5.6	5.2
24.6	1	6	7	6
	2	5	8	7
	3	4	6	5
	4	5	8	5
	5	7	6	7
	x	5.4	7	6
34.4	1	7	7	6
	2	8	7	7
	3	8	6	8
	4	8	8	6
	5	9	10	9
	x	8	7.6	7.2
44.3	1	4	4	4
	2	7	3	5
	3	5	2	3
	4	6	4	4
	5	6	6	4
	x	5.6	3.8	4

Apéndice N° 8: Valores la altura obtenida en los reactores de inmersión temporal de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano)

Explante	Tratamiento	Altura (cm)
1	T1	4.8
2	T1	3.3
3	T1	3.3
4	T1	3.8
5	T1	4.8
6	T1	4.7
7	T1	3.2
8	T1	3.3
9	T1	4.5
10	T1	2.7
11	T1	3.5
12	T1	4.7
13	T1	2.9
14	T1	4
15	T1	4.5
1	T2	5.5
2	T2	6.1
3	T2	5.5
4	T2	5.8
5	T2	6.9
6	T2	5.9
7	T2	5.4
8	T2	7.3
9	T2	7.4
10	T2	7.3
11	T2	5.2
12	T2	5.4
13	T2	5.2
14	T2	7.2
15	T2	6.5
1	T3	4.6
2	T3	6.1
3	T3	5.7
4	T3	6.3
5	T3	4.7
6	T3	6.3
7	T3	6.1
8	T3	4.8
9	T3	6.8
10	T3	6.7
11	T3	4.7

12	T3	5.8
13	T3	5.4
14	T3	5.6
15	T3	6.1
1	T4	4.6
2	T4	4.6
3	T4	4.4
4	T4	4.9
5	T4	5.8
6	T4	5.3
7	T4	5.7
8	T4	4.7
9	T4	4.9
10	T4	3.7
11	T4	6.1
12	T4	3.9
13	T4	4.1
14	T4	4.5
15	T4	5.6
1	T5	5.8
2	T5	4.6
3	T5	5.9
4	T5	4.3
5	T5	4.5
6	T5	5.4
7	T5	5.3
8	T5	6.3
9	T5	6.1
10	T5	4.5
11	T5	6.7
12	T5	4.8
13	T5	6.7
14	T5	6
15	T5	6.1
1	T6	6.3
2	T6	4.9
3	T6	5.2
4	T6	5.2
5	T6	4.2
6	T6	6.3
7	T6	5.8
8	T6	6.3
9	T6	4.6
10	T6	6.1
11	T6	5.2
12	T6	4.2
13	T6	5.6

14	T6	4.2
15	T6	4.2
1	T7	3.8
2	T7	5.1
3	T7	4.7
4	T7	5.5
5	T7	5
6	T7	3.5
7	T7	4.8
8	T7	3.9
9	T7	3.8
10	T7	3.2
11	T7	3.5
12	T7	3.6
13	T7	5.3
14	T7	5.4
15	T7	4.3
1	T8	4.3
2	T8	3.7
3	T8	5.6
4	T8	4.3
5	T8	4.4
6	T8	5.4
7	T8	4
8	T8	5.4
9	T8	4.3
10	T8	5.6
11	T8	4.3
12	T8	5.1
13	T8	3.9
14	T8	3.7
15	T8	3.3
1	T9	3
2	T9	3.5
3	T9	3.5
4	T9	4.8
5	T9	2.9
6	T9	2.6
7	T9	4.5
8	T9	4.1
9	T9	2.9
10	T9	4.8
11	T9	3.7
12	T9	3.6
13	T9	3.4
14	T9	4.6
15	T9	3.4

Apéndice N° 9: Valores del número de hojas obtenidas en los reactores de inmersión temporal de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano)

Explante	Tratamiento	Numero de Hojas
1	T1	10
2	T1	13
3	T1	12
4	T1	9
5	T1	10
6	T1	10
7	T1	8
8	T1	11
9	T1	12
10	T1	10
11	T1	11
12	T1	11
13	T1	12
14	T1	13
15	T1	11
1	T2	12
2	T2	15
3	T2	15
4	T2	13
5	T2	15
6	T2	14
7	T2	13
8	T2	15
9	T2	15
10	T2	16
11	T2	11
12	T2	11
13	T2	14
14	T2	15
15	T2	12
1	T3	15
2	T3	17
3	T3	16
4	T3	15
5	T3	12
6	T3	11
7	T3	16
8	T3	13
9	T3	12
10	T3	12
11	T3	14

12	T3	14
13	T3	17
14	T3	14
15	T3	15
1	T4	14
2	T4	13
3	T4	10
4	T4	9
5	T4	13
6	T4	13
7	T4	11
8	T4	12
9	T4	12
10	T4	12
11	T4	12
12	T4	14
13	T4	11
14	T4	11
15	T4	11
1	T5	10
2	T5	15
3	T5	14
4	T5	12
5	T5	15
6	T5	11
7	T5	15
8	T5	12
9	T5	13
10	T5	11
11	T5	11
12	T5	9
13	T5	12
14	T5	14
15	T5	9
1	T6	13
2	T6	10
3	T6	14
4	T6	15
5	T6	10
6	T6	11
7	T6	13
8	T6	12
9	T6	13
10	T6	14
11	T6	11
12	T6	11
13	T6	13

14	T6	13
15	T6	14
1	T7	14
2	T7	10
3	T7	12
4	T7	13
5	T7	9
6	T7	13
7	T7	13
8	T7	10
9	T7	12
10	T7	10
11	T7	11
12	T7	10
13	T7	11
14	T7	10
15	T7	13
1	T8	10
2	T8	8
3	T8	12
4	T8	12
5	T8	13
6	T8	11
7	T8	13
8	T8	9
9	T8	11
10	T8	12
11	T8	12
12	T8	10
13	T8	8
14	T8	10
15	T8	10
1	T9	15
2	T9	11
3	T9	15
4	T9	14
5	T9	10
6	T9	11
7	T9	15
8	T9	11
9	T9	13
10	T9	11
11	T9	10
12	T9	13
13	T9	15
14	T9	10
15	T9	13

Apéndice N° 10. Valores de los coeficientes de multiplicación obtenidos en el cultivo *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano)

Explante	Tratamiento	CM
1	T1	8
2	T1	5
3	T1	5
4	T1	9
5	T1	3
1	T2	5
2	T2	9
3	T2	7
4	T2	6
5	T2	5
1	T3	2
2	T3	7
3	T3	7
4	T3	8
5	T3	6
1	T4	9
2	T4	8
3	T4	5
4	T4	7
5	T4	2
1	T5	6
2	T5	8
3	T5	8
4	T5	7
5	T5	5
1	T6	9
2	T6	7
3	T6	4
4	T6	7
5	T6	3
1	T7	3
2	T7	8
3	T7	10
4	T7	7
5	T7	4
1	T8	9
2	T8	5
3	T8	8
4	T8	7

5	T8	9
1	T9	9
2	T9	6
3	T9	6
4	T9	7
5	T9	8
1	T10	5
2	T10	6
3	T10	12
4	T10	10
5	T10	12
1	T11	6
2	T11	12
3	T11	5
4	T11	9
5	T11	9
1	T12	4
2	T12	6
3	T12	11
4	T12	10
5	T12	9
1	T13	3
2	T13	8
3	T13	7
4	T13	9
5	T13	2
1	T14	6
2	T14	3
3	T14	3
4	T14	4
5	T14	6
1	T15	2
2	T15	5
3	T15	2
4	T15	4
5	T15	6

Apéndice N° 11. Valores de los coeficientes de multiplicación obtenidos en los reactores de inmersión temporal de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano)

Explante	Tratamiento	CM
1	T1	15
2	T1	14
3	T1	15
4	T1	16
5	T1	13
6	T1	17
7	T1	19
8	T1	14
9	T1	14
10	T1	18
11	T1	18
12	T1	17
13	T1	19
14	T1	19
15	T1	18
1	T2	19
2	T2	20
3	T2	22
4	T2	23
5	T2	18
6	T2	23
7	T2	19
8	T2	19
9	T2	22
10	T2	18
11	T2	21
12	T2	22
13	T2	18
14	T2	23
15	T2	22
1	T3	18
2	T3	22
3	T3	21
4	T3	21
5	T3	23
6	T3	23
7	T3	20
8	T3	21
9	T3	22
10	T3	21
11	T3	23

12	T3	20
13	T3	21
14	T3	23
15	T3	21
1	T4	20
2	T4	17
3	T4	17
4	T4	19
5	T4	20
6	T4	21
7	T4	16
8	T4	20
9	T4	21
10	T4	17
11	T4	16
12	T4	17
13	T4	15
14	T4	18
15	T4	15
1	T5	16
2	T5	21
3	T5	15
4	T5	21
5	T5	17
6	T5	18
7	T5	17
8	T5	18
9	T5	16
10	T5	21
11	T5	19
12	T5	19
13	T5	17
14	T5	19
15	T5	21
1	T6	20
2	T6	18
3	T6	21
4	T6	18
5	T6	20
6	T6	21
7	T6	19
8	T6	17
9	T6	16
10	T6	20
11	T6	16
12	T6	18
13	T6	18

14	T6	18
15	T6	22
1	T7	19
2	T7	15
3	T7	19
4	T7	20
5	T7	16
6	T7	18
7	T7	19
8	T7	14
9	T7	15
10	T7	19
11	T7	17
12	T7	16
13	T7	17
14	T7	16
15	T7	17
1	T8	15
2	T8	16
3	T8	17
4	T8	16
5	T8	16
6	T8	15
7	T8	14
8	T8	16
9	T8	17
10	T8	17
11	T8	14
12	T8	19
13	T8	14
14	T8	17
15	T8	18
1	T9	12
2	T9	11
3	T9	15
4	T9	15
5	T9	16
6	T9	10
7	T9	15
8	T9	10
9	T9	14
10	T9	16
11	T9	10
12	T9	16
13	T9	13
14	T9	13
15	T9	12

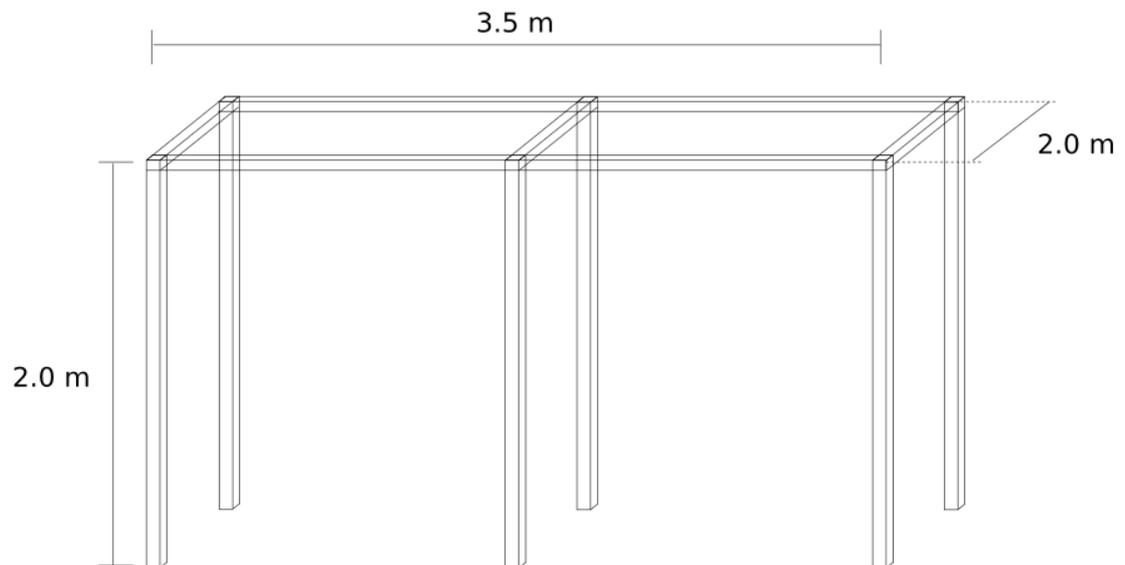
Apéndice N° 12: Pruebas de multiplicación con BAP

Para el establecimiento un vitro de arándano, se utilizó BAP como citocinina reguladora del crecimiento a diferentes concentraciones junto con ANA; las cuales fueron BAP a 4.4, 22.2, 44.3 y 66.5 μM con ANA a 0, 5.4, 16.1 y 26.9 μM . Sin embargo no se logró la multiplicación del arándano debido a la muerte apical que presentaron los explantes.

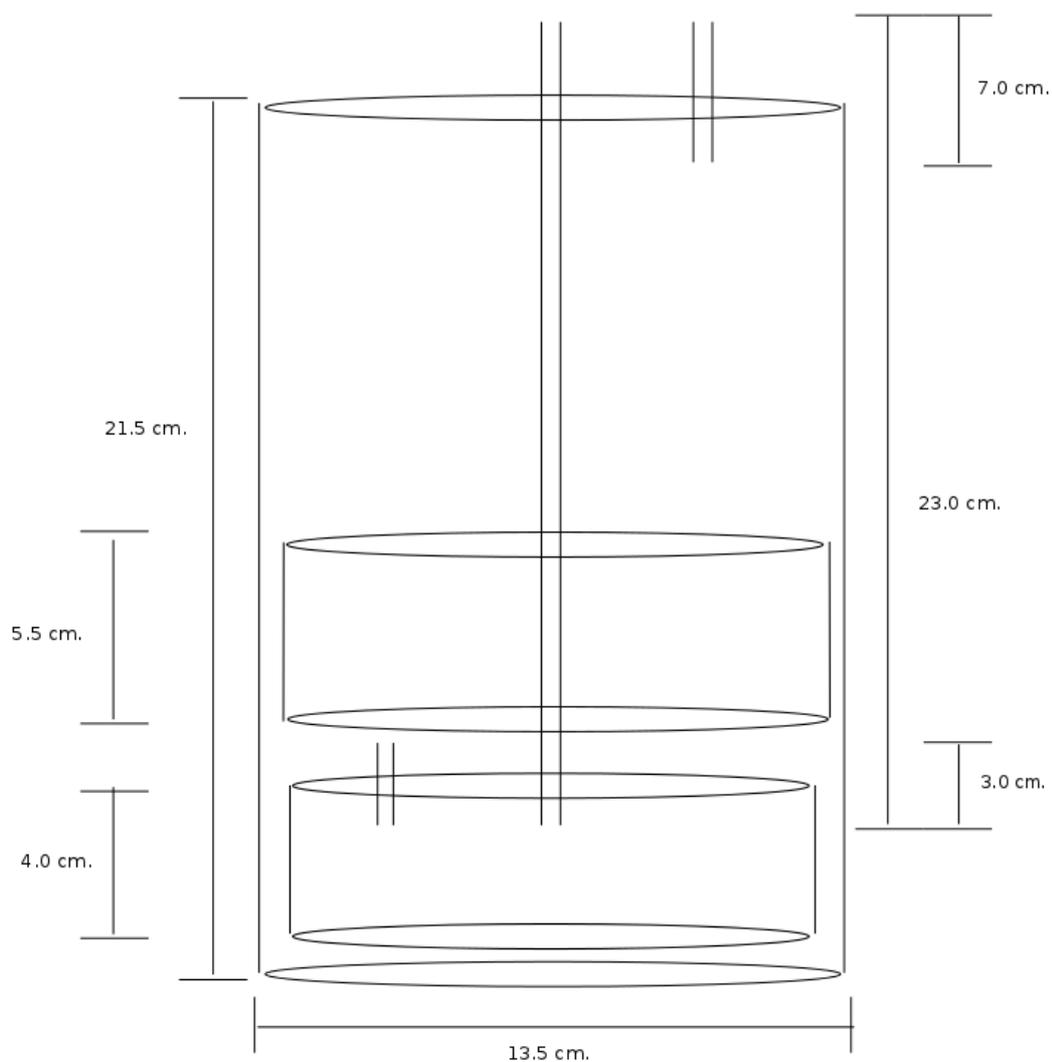


Apéndice N° 13: Mantenimiento de las plantas madre

Las plantas madres utilizadas durante el trabajo de investigación fueron mantenidas en un vivero construido con una estructura de madera y malla raschel 50 %.



Apéndice N° 14: Planos de construcción del reactor de inmersión temporal



Apéndice N° 15: Diferencia de Costo entre un el reactor de inmersión temporal diseñado y el reactor RITA®

Precio de reactor RITA ®

Plant tissue culture system temporary immersion

1 Product Result | Match Criteria: Description

Z373206 pore size 1 µm, diam. 37 mm (Sigma)		◇ MSDS	close	▲
SKU-Pack Size	Availability	Price (USD)	Quantity	
Z373206-1EA	✓ Ships on 13.01.14 - FROM	181.00	<input type="text" value="0"/>	★ i

Precio: \$ 181 ≈ S/. 508

Obtenido de: SIGMA – ALDRICH®

Precio reactor de Inmersión Temporal diseñado.

Reactor		
Componente	Cantidad	Costo (S/.)
Frasco de plástico 3L circular	1	5.5
Recipiente porta CD`s	1	0.5
Recipiente de plástico pequeño	1	0.5
Tubo de vidrio 23 cm	1	1.5
Tubo de vidrio 7 cm	1	0.4
Filtro de Esponja 1.5 cm x 1.5 cm x 3 cm	2	0.4
Manguera de Pecera	1	1
TOTAL		9.8

Sistema de Automatización		
Componente	Cantidad	Costo (S/.)
Bomba de Aire	1	20
Temporizador digital	1	60
Estantería	1	20
Fluorescentes	4	20
TOTAL		120

Precio: S/.130