

Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**CULTIVO *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi EN LA ETAPA DE  
MULTIPLICACIÓN DE PROPÁGULOS**

TESIS QUE PRESENTA:

Erika Quetzally Santiago Pablo

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS**

DIRECTOR:

Dr. José Raymundo Enríquez del Valle

CODIRECTOR:

Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados

---

Ex Hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca.





Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**CULTIVO *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi EN LA ETAPA DE  
MULTIPLICACIÓN DE PROPÁGULOS**

TESIS QUE PRESENTA:

Erika Quetzally Santiago Pablo

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN  
AGROECOSISTEMAS**

DIRECTOR:

Dr. José Raymundo Enríquez del Valle

CODIRECTOR:

Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados



---

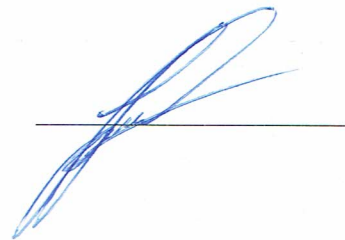
Ex Hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca.  
Agosto de 2023.

La presente tesis titulada: **CULTIVO *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi EN LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN DE PROPÁGULOS**, fue realizada bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS**

DIRECTOR:

Dr. JOSÉ RAYMUNDO ENRÍQUEZ DEL VALLE



CODIRECTOR

Dra. MARÍA DEL CARMEN ROCHA GRANADOS



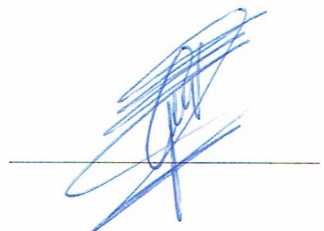
ASESOR:

Dr. VICENTE ARTURO VELASCO VELASCO



ASESOR:

Dr. GERARDO RODRÍGUEZ ORTIZ



Ex-Hacienda de Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca. Agosto de 2023.

	<b>Nombre de la Información Documentada:</b> <b>Formato Autorización del comité para entrega de tesis.</b>	<b>Código: ITVO-AC-PR-08-02</b>
	<b>Referencia a la Norma ISO 9001:2015 8.2.1, 8.2.2, 8.2.3, 8.5.2</b>	<b>Revisión: 1</b>
		<b>Página 1 de 1</b>

Nazareno Xoxocotlán, Oaxaca; a 28 de junio del 2023.

OFICIO No. DEPI/0513/2023

**C. ERIKA QUETZALLY SANTIAGO PABLO**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS**  
**EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS**  
**P R E S E N T E**

Los que suscriben, miembros de su Comité Tutorial, le comunicamos que hemos revisado el contenido de su tesis “**CULTIVO *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi EN LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN DE PROPÁGULOS**”. Por lo que con base en los lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México se le otorga la **AUTORIZACIÓN** para que proceda a la entrega del documento final de la misma en formato digital (PDF); para continuar con su trámite y asignarle la fecha de su examen de grado.

Sin más por el momento nos permitimos reconocer su esfuerzo y felicitarle por el logro de su documento de tesis.


**ATENTAMENTE**  
*“Ciencia y Tecnología para el Campo”*

  
 DR. JOSÉ RAYMUNDO ENRÍQUEZ DEL VALLE  
 DIRECTOR DE TESIS

  
 DR. VICENTE ARTURO VELASCO VELASCO  
 ASESOR

  
 DRA. MARIA DEL CARMEN ROCHA GRANADOS  
 CO-DIRECTORA

  
 DR. GERARDO RODRIGUEZ ORTIZ  
 ASESOR

	<b>Nombre de la Información Documentada:</b> <b>Formato Autorización de DEPI para entrega de Tesis.</b>	<b>Código: ITVO-AC-PR-08-03</b>
	<b>Referencia a la Norma ISO 9001:2015 8.2.1, 8.2.2, 8.2.3, 8.5.2</b>	<b>Revisión: 1</b>
		<b>Página 1 de 1</b>

Nazareno Xoxocotlán, Oaxaca, **30/junio/2023**

OFICIO No. DEPI/535/2023

**C. ERIKA QUETZALLY SANTIAGO PABLO**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS**  
**EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS**  
**P R E S E N T E**

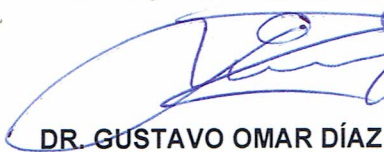


Con base en los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, respecto a la presentación del examen de grado, me es muy grato comunicarle que esta División de Estudios de Posgrado e Investigación a mi cargo, **AUTORIZA** la entrega del documento final de su tesis en formato digital (PDF) titulada: **“CULTIVO *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* var. *Biloxi* EN LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN DE PROPÁGULOS”**.

Cuyo contenido ha sido revisado y aprobado por su Comité Tutorial y cumple en lo general con el formato establecido para este documento, como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Productividad en Agroecosistemas.

Sin más por el momento le felicito cordialmente por el logro de esta meta y le reitero el respaldo institucional de su Alma Mater.

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica®*  
**“Ciencia y Tecnología para el Campo”**




  
**INSTITUTO TECNOLÓGICO DEL VALLE DE OAXACA**  
**DR. GUSTAVO OMAR DÍAZ ZORRILLA**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

El presente trabajo se llevó a cabo con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), a través del número de becario (1154187), con el tema de investigación: "Cultivo *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi en la etapa de multiplicación de propágulos".

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	i
ÍNDICE DE CUADROS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
RESUMEN.....	6
ABSTRACT .....	7
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo general.....	2
1.1.1 Objetivos específicos.....	2
1.2 Hipótesis .....	3
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	4
2.1 <i>Vaccinium corymbosum</i> .....	4
2.1.1 Clasificación botánica.....	4
2.1.2 Descripción de <i>Vaccinium sp</i> .....	5
2.1.3 Propagación del Arándano .....	7



2.2 Medios de cultivos.....	7
2.2.1 Componentes del cultivo <i>in vitro</i> .....	8
2.2.2 pH del medio .....	13
2.2.3 Tipos de medios de cultivo .....	13
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
CAPÍTULO IV. CRECIMIENTO DE BROTES DE <i>Vaccinium corymbosum</i> EN MEDIOS DE CULTIVOS CON DIFERENTES SALES INORGÁNICAS Y pH.....	16
4.1 Resumen.....	16
4.2 Abstract.....	17
4.3 Introducción .....	17
4.4 Materiales y métodos .....	19
4.5 Resultados y discusión .....	24
4.6 Conclusiones .....	30
4.7 Referencias bibliográficas .....	31
CAPÍTULO V. SALES INORGÁNICAS Y 2iP EN MEDIOS DE CULTIVOS PARA PROLIFERACIÓN DE BROTES DE <i>Vaccinium corymbosum</i> .....	35
5.1 Resumen.....	35
5.2 Abstract.....	36
5.3 Introducción .....	36
5.4 Materiales y métodos .....	38

5.5 Resultados y discusión .....	42
5.6 Conclusiones .....	45
5.7 Referencias bibliográficas .....	45
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES.....	48
CAPÍTULO VII. LITERATURA CITADA.....	50

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Concentración de sales inorgánicas de los medios de cultivo MS y WPM.....	14
2	Composición mineral de tres soluciones nutritivas utilizadas en el cultivo <i>in vitro</i> de arándano.....	20
3	Resumen de nueve análisis de varianza del desarrollo <i>in vitro</i> de brotes de <i>Vaccinium corymbosum</i> var. Biloxi a partir de yemas axilares o ápicales establecidos en medios de cultivo que variaron en tipo de sales minerales y pH.....	25
4	Características de los brotes <i>Vaccinium corymbosum</i> var. Biloxi cultivados <i>in vitro</i> a los 40, 80 y 120 días de incubación, en función de los niveles de los factores.....	27
5	Desarrollo de brotes de arándano en medios de cultivo con diferentes condiciones de sales inorgánicas y pH.....	28
6	Resumen del análisis de varianza de diversas variables de brotes de <i>Vaccinium corymbosum</i> , cultivados <i>in vitro</i> en medios de cultivo que variaron en concentraciones de citocininas y sales minerales.....	42
7	Características de propágulos de <i>Vaccinium corymbosum</i> cultivados <i>in vitro</i> en función de niveles de factores principales.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Proceso de propagación <i>in vitro</i> de plantas de arándano. a) Planta orteto, b) segmentos apicales y axilares, c) lavado de segmentos, d) desinfección de segmentos, e) Multiplicación de brotes y f) brote obtenido <i>in vitro</i> .....	24

## RESUMEN

Se realizaron dos experimentos independientes establecidos cada uno según un diseño completamente al azar y realizándose análisis de varianza y comparación de medias por Duncan ( $\alpha=0.05$ ). El objetivo general fue generar un esquema de propagación *in vitro* para *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi, en la etapa de multiplicación de propágulos en medios de cultivo con diferentes sales inorgánicas, pH y 2iP. El primer experimento consistió en la evaluación de la proliferación *in vitro* de brotes de arándano, en medios que variaron en sales inorgánicas (WPM50%, MS50% y MS50%-WPM50%), niveles de pH (4.5, 5.0 y 5.5) y segmentos de tallo axilares y apicales de 2 cm de longitud. En el segundo experimento se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de 2iP y sales inorgánicas en la proliferación de brotes arándano durante la etapa de multiplicación de propágulos. En ambos experimentos se evaluaron las variables longitud de brote, número de hojas y número de brotes a los 40, 80 y 120 días de incubación. El medio con sales inorgánicas MS50%-WPM50 % y nivel de pH 4.5-5.0, proporcionaron mayores condiciones para el crecimiento de los brotes de arándano. El medio MS50% proporciono mejores condiciones para el crecimiento de longitud de brote y número de hojas, y para número de brote la mejor condición fue la combinación MS50%-WPM50%. La longitud de brote y número de hojas mostraron mayor crecimiento y desarrollo en medios de cultivo suplementados con 4 mg L<sup>-1</sup> de 2-iP, y para número de brote la mejor condición fue 6 mg L<sup>-1</sup>.

**Palabras clave:** Sales inorgánicas, pH, 2iP

## ABSTRACT

Two independent experiments were carried out, each established according to a completely randomized design and performing analysis of variance and comparison of means by Duncan ( $\alpha=0.05$ ). The general objective was to generate an *in vitro* propagation scheme for *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi, in the propagule multiplication stage in culture media with different inorganic salts, pH, and 2iP. The first experiment consisted of evaluating the *in vitro* destruction of blueberry shoots, in media that varied in inorganic salts (WPM50%, MS50%, and MS50%-WPM50%), pH levels (4.5, 5.0, and 5.5), and segments. axillary and apical stem 2 cm long. In the second experiment, the effect of different concentrations of 2iP and inorganic salts on the proliferation of blueberry shoots during the propagule multiplication stage was evaluated. In both experiments, the variables shoot length, number of leaves, and number of shoots were evaluated at 40, 80, and 120 days of incubation. The medium with inorganic salts MS50%-WPM50% and pH level 4.5-5.0, will provide better conditions for the growth of blueberry sprouts. The MS50% medium provides better conditions for the growth of shoot length and number of leaves, and for shoot number, the best condition was the combination MS50%-WPM50%. The shoot length and number of leaves showed greater growth and development in culture media supplemented with 4 mg L<sup>-1</sup> of 2-iP, and for shoot number, the best condition was 6 mg L<sup>-1</sup>.

**Keywords:** inorganic salts, pH, 2iP

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN

El arándano, *Vaccinium corymbosum* es un arbusto perenne de hoja caduca, que pertenece a la familia Ericaceae, nativo de Norteamérica. Su fruto es una baya de color azul o roja que contienen compuestos fitoquímicos (antocianinas, flavonoides y ácido clorogénico) que tiene efectos benéficos para la salud, ya que previenen enfermedades crónicas como: enfermedades neurodegenerativas, trastornos cardiovasculares, cáncer y diabetes (Maya-Cano *et al.*, 2021; Georgieva y Kondakova, 2021; Hunková *et al.*, 2020; Schuchovski y Biasi, 2019; Wang *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2018; Hung *et al.*, 2016; Hine-Gómez y Abdelnour-Esquivel, 2013; Rodríguez-Mateos, 2012). Esto ha generado alta demanda a nivel mundial, y ha propiciado el establecimiento de huertos comerciales en México (SIAP,2022).

Los principales países productores son Estados Unidos, Canadá, Chile, Perú y España (USDA, 2021). México ocupa el sexto lugar en producción de arándano, y durante el año 2021 produjo 66,482 t. Los estados con mayor producción son Jalisco, Michoacán y Sinaloa (SIAP, 2022). Aunque no existen registros de la producción en Oaxaca, en donde hay regiones que presentan condiciones edafológicas y climáticas apropiadas para este

cultivo. Para asegurar su éxito productivo es necesario contar con productores locales de material vegetal que permitan establecer huertos comerciales con plantas que posean calidad genética, morfológica, fisiológica y fitosanitaria, dicho material se produce utilizando la técnica de cultivos de tejidos vegetales que permite producir gran número de plántulas genéticamente uniformes y libre de patógenos.

Para lo cual, es indispensable generar un protocolo de propagación vegetal masivo a partir de plantas madre u orteto de variedades exitosas en Oaxaca. Se han realizado investigaciones previas sobre el cultivo *in vitro* de arándanos, pero el tipo y la concentración de reguladores del crecimiento y la combinación de sales del medio de cultivo que permita un desarrollo rápido y eficaz de los explantes iniciales son cruciales en las técnicas de cultivo de tejidos (Schuchovski, y Biasi, 2019). Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación es generar un esquema de propagación *in vitro* para arándano (*Vaccinium corymbosum* var. Biloxi), en la etapa de multiplicación de propágulos en medios de cultivo con diferentes sales inorgánicas, pH y 2iP.

## **1.1 Objetivo general**

Generar un esquema de propagación *in vitro* para arándano (*Vaccinium corymbosum* var. Biloxi), en la etapa de multiplicación de propágulos en medios de cultivo con diferentes sales inorgánicas, pH y 2iP.

### **1.1.1 Objetivos específicos**

Evaluar el crecimiento *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi en medios de cultivo con diferentes sales inorgánicas y niveles de pH.



Evaluar el efecto de la concentración del 2iP y sales inorgánicas en la proliferación de brotes de *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi.

## 1.2 Hipótesis

Brotes de *Vaccinium corymbosum* cultivados *in vitro* mostrarán diferencias de desarrollo al establecerlos en medios de cultivos que difieran en concentraciones de 2iP, sales minerales y niveles de pH

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 *Vaccinium corymbosum*

##### 2.1.1 Clasificación botánica

El arándano es un arbusto perenne, pertenece a la familia Ericaceae, subfamilia Vacciniaceae, subgénero Cyanococcus, género *Vaccinium* (Hine-Gómez y Abdelnour-Esquivel, 2013; Retamales y Hancock, 2012; Ratnaparkhe, 2007; Darnell, 2000).

La identificación de las especies del subgénero Cyanococcus ha sido problemática debido a la poliploidía, la superposición de morfologías, la amplia hibridación y una falta general de diferenciación cromosómica (Ratnaparkhe, 2007).

Existen tres especies de importancia económica: arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.), arándano bajo (*Vaccinium angustifolium* Ait.), y arándano ojo de conejo (*Vaccinium*

*ashei* Reade sin. *Vaccinium virgatum* Ait.) (Retamales y Hancock, 2012; Ratnaparkhe, 2007; Darnell, 2000).

### 2.1.2 Descripción de *Vaccinium sp*

De acuerdo con Retamales y Hancock, (2012); todas las especies de *Vaccinium sp* son perennes leñosas, los arbustos bajos alcanzan de 0.1 a 0.15 m de altura, mientras que las plantas de arbusto alto pueden alcanzar de 1.8 a 4.0 m y los rabbiteyes pueden llegar a los 6 m de altura. El arbusto de arándanos se compone de brotes que emergen de plantas recién formadas o yemas latentes previamente formadas ubicadas en la copa, a estas se les llaman cañas. El crecimiento de los brotes es simpodial y episódico.

Las hojas del arándano son simples, enteras o dentadas y dispuestas alternativamente a lo largo del tallo, la forma varía entre elíptica, espatulada, oblanceolada y ovalada. La mayoría de las especies highbush y rabbiteye son de hoja caduca, aunque algunas de las variedades de bajo enfriamiento pueden ser perennes si las temperaturas se mantienen por encima del punto de congelación.

Los botones florales son grandes y redondos, mientras que los cogollos vegetativos son más pequeños, estrechos y puntiagudos. El vegetativo latente mide unos 4 mm de largo, con un solo ápice. La inflorescencia del arándano es un racimo.

La corola del arándano es unida, con cuatro o cinco lóbulos; y es de color blanco sólido a rosa con flecos. La corola está invertida y tiene forma de globo o urna. El pistilo puede

ser un poco más largo a un poco más corto que la corola. El ovario es inferior y tiene de cuatro a cinco cavidades (lóculos), con varios o muchos óvulos en cada lóculo.

En los arándanos es necesario un polinizador y existe una amplia gama de autofertilidad entre los cultivares de arándanos, mientras que no es conveniente la autofecundación debido a la depresión por endogamia de acción temprana.

El fruto es una verdadera baya con muchas semillas, que madura entre dos y tres meses después de la polinización. El periodo de desarrollo del fruto oscila entre 42 y 92 días en los arbustos altos, de 55 a 60 días en los arbustos bajos y de 60 a 135 días en el rabbiteye.

Los arándanos tienen dos tipos principales de raíces: raíces gruesas de almacenamiento (de hasta 11 mm) y raíces finas en forma de hilo (pequeñas, de 1 mm), las primeras anclan las plantas y desempeñan una función de almacenamiento, mientras que las segundas son principalmente responsables de la absorción de agua y nutrientes. Las raíces de los arándanos no tienen pelos radiculares y están habitados por una micorriza ericoides.

#### 2.1.2.1 Biloxi

Es un arbusto con alto vigor y productividad. Las bayas son de tamaño pequeño a mediano, con una cicatriz mediana, de color azul claro, muy firmes y de buen sabor. La

variedad está adaptada a climas cálidos que comprenden entre los 1,000 a los 2,300 msnm, es precoz y tiene requerimientos entre 200 y 600 horas frío.

Es una variedad libre de patente que se pueden reproducir para su producción en cualquier estado y para cualquier productor que quiera iniciarse en el cultivo del arándano o quiera expandir su producción (Retamales y Hancock, 2012).

### 2.1.3 Propagación del Arándano

Los cultivos de arándanos se propagan principalmente de forma vegetativa a través de esquejes, la cual no garantiza calidad genética, morfológica, fisiológica y fitosanitaria. En los últimos años la propagación *in vitro* o por cultivo de tejidos vegetales (CTV), ha sido una técnica que se ha empleado para la propagación de berries, utilizando la embriogénesis somática u organogénesis (directa e indirecta) (Georgieva y Kondakova, 2021; Schuchovski *et al.*, 2020; Mohammad *et al.*, 2014; Tsamura, 2008; Retamales y Hancock, 2012; Victoriano, 2010).

## 2.2 Medios de cultivos

El medio de cultivo es un elemento de la técnica de cultivo *in vitro* que funciona a la vez como sustrato y fuente de nutrimentos orgánicos e inorgánicos, reguladores de crecimiento, energética para el desarrollo de los tejidos.

Los medios de cultivo son una combinación de diferentes componentes, los cuales varían proporcionalmente de acuerdo con las características del tejido a desarrollar (callo, porciones de hoja, células, porciones de tallo, etc.) y el proceso morfogénico que se

desea seguir (cultivo de meristemas, organogénesis, embriogénesis somática, etc.) (Bhojwani y Dantu, 2013; George y Klerk, 2008).

### 2.2.1 Componentes del cultivo *in vitro*

Los medios de cultivo están compuestos por agua, carbohidratos, reguladores de crecimiento, vitaminas y nutrimentos minerales esenciales específicos para cada especie vegetal y etapa de propagación (Greenway *et al.*, 2012; George y Klerk, 2008).

El agua constituye más del 95% de cualquier medio de cultivo y es el solvente de todos los solutos que componen el medio. El agua potable corriente contiene elementos disueltos orgánicos e inorgánicos, partículas sólidas de diversa naturaleza y microorganismos que pueden afectar la calidad del medio, es necesario aplicar mecanismos que permitan alcanzar un alto grado de pureza del agua corriente antes de ser utilizada para las preparaciones de medios; entre estos mecanismos se encuentran la destilación, la deionización y la osmosis inversa (Pierik, 1997).

Minerales están presentes en el medio de cultivo constituyen todos aquellos elementos inorgánicos que son importantes para el desarrollo de la planta (macroelementos y microelementos). Macronutrientes, Las necesidades básicas de elementos minerales como el potasio, el calcio, el magnesio, el nitrógeno, el fósforo y el azufre, que se requieren en grandes cantidades. Micronutrientes, se requieren en cantidades menores en comparación a los macronutrientes, son esenciales para el crecimiento de los tejidos en los cultivos *in vitro*. Los micronutrientes actúan como cofactores de las enzimas (Bhojwani y Dantu, 2013).

Compuestos orgánicos, están conformados por moléculas con átomos de carbono enlazados covalentemente con otro átomo de carbono o hidrógeno. Dentro de los compuestos orgánicos que se utilizan en el medio de cultivo están los carbohidratos o fuentes energéticas, las vitaminas, los reguladores de crecimiento y algunos suplementos.

Carbohidratos, las plantas producen sus propias fuentes de energía (autótrofos); sin embargo, en condiciones *in vitro*, por la ausencia de fotosíntesis los organismos vegetales necesitan de una fuente de carbohidratos para poder crecer y desarrollarse (heterótrofos), por lo que la mayoría de los medios deben ser suplementados con compuestos que actúen como fuentes de energía. Dentro de las fuentes más comunes de carbohidratos usadas en cultivos *in vitro* están: sacarosa, maltosa, galactosa, manosa y lactosa (Bonga y Durzan, 1987).

Vitaminas, las plantas en su estado natural suplen sus propias necesidades vitamínicas; sin embargo, los tejidos y células vegetales cultivados *in vitro* requieren de suplementos externos de estos compuestos para llevar a cabo sus procesos de crecimiento y desarrollo, siendo las más comunes las siguientes: Tiamina (Vitamina B1), Ácido nicotínico (Niacina o Vitamina B3), Mio-inositol, Ácido ascórbico (Vitamina C).

Reguladores de crecimiento, son sustancias químicas que están presentes en los tejidos vegetales (es decir, endógenas), tienen una función reguladora en el crecimiento y el desarrollo. Son activos a concentraciones muy bajas, se denominan hormonas vegetales

o reguladores de crecimiento vegetal (Machakova *et al.*, 2008). Los tejidos *in vitro* generalmente no producen las cantidades necesarias de reguladores para suplir las necesidades de sus procesos, por lo que es necesario suplementar con fuentes exógenas. Las hormonas o reguladores de crecimiento clásicos son las auxinas, citocininas, giberelinas, el ácido abscísico y el etileno (Suárez, 2011).

Auxinas, son reguladores de crecimiento que estimulan la dominancia apical, el crecimiento y la división celular, el desarrollo meristemático, la inducción de raíces adventicias y la formación de embriones somáticos. En su estado natural la planta produce el ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB), los cuales son sintetizados en los ápices foliares desde donde se desplazan en forma basipétala a la parte radical. Entre los compuestos análogos a las auxinas, sintetizados en laboratorio, están el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y el picloram. En el cultivo *in vitro*, los más usados son el IBA y el ANA en la micropropagación de meristemas y organogénesis. El 2,4-D y el picloram tienen efectos más fuertes, por lo que son utilizados en la inducción de tejidos embriogénicos. El AIA por su facilidad para ser degradado enzimáticamente es menos utilizado.

Citocininas son reguladores de crecimiento que actúan en la interrupción de la dominancia apical en el tallo, división celular, desarrollo de yemas axilares y retardo de la senescencia de hojas. Son sintetizadas en los ápices radicales desde donde son transportadas a las yemas apicales y axilares. Naturalmente, la zeatina y el 2-isopentenil adenina (2iP) son sintetizadas por la planta, pero en el comercio se pueden encontrar



sustitutos como la benzilaminopurina (BAP o BA), la kinetina y el tidiazuron (TDZ). De todos estos compuestos, BA es la más utilizada en cultivo *in vitro*, especialmente en la multiplicación de meristemas preexistentes y organogénesis (Polo *et al.*, 2013; López *et al.*, 2017).

Giberelinas, son compuestos que promueven el alargamiento de los entrenudos de la planta mediante la inducción de la división y elongación celular. La síntesis en plantas completas ocurre principalmente en las hojas jóvenes. Aunque existen más de 90 compuestos similares, la giberelina más comúnmente utilizada en cultivo *in vitro* es el ácido giberélico (GA3), el cual es adicionado al medio de cultivo para promover la elongación de tallos micropropagados y conversión de embriones somáticos en plantas. Se ha observado efecto inhibitorio en formación de nuevos tallos y raíces y la inducción de tejidos embriogénicos, por lo que es inconveniente su uso en los eventos de multiplicación de brotes y emisión de raíces. GA3 es alterado en su estructura por el calor, por lo que es mejor esterilizar a través de filtración (Pierik, 1997).

Ácido abscísico, regulador de crecimiento, es el encargado de controlar la apertura y cierre de estomas, inhibir la elongación y división celular, promover cierto grado de abscisión foliar e inducir la dormancia de las semillas. Su sitio de origen son las raíces y las hojas adultas desde donde se desplaza a sus sitios de acción. En condiciones *in vitro* inhibe la formación de callo y es utilizado para inducir la maduración de embriones somáticos y la formación de órganos de almacenamiento y dormancia como cormos y

microtubérculos. No es soluble en agua por lo que debe ser diluido en etanol (Suárez y Otero, 2016; Suarez *et al.*, 2017; Carmona, 2017).

El etileno es un gas que es sintetizado a partir del aminoácido metionina y se produce en la mayoría de los tejidos vegetales. En plantas induce la senescencia y abscisión de hojas y flores, la formación de raíces adventicias y elimina la dormancia de semillas y yemas. Su presencia se torna inconveniente en condiciones *in vitro*, por lo que algunas veces la ventilación de los tejidos es necesario para evitar su acumulación.

Existen dos estados para la consistencia del medio de cultivo, y éstos dependen de la presencia o ausencia de un medio de soporte. Los medios líquidos generalmente están conformados únicamente por la formulación de compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos en agua sin ningún tipo de medio de soporte; de forma inversa, los medios en estado semi sólido adquieren cierta dureza proporcionada por agentes gelificantes (Pierik, 1997).

Agar: Es el agente gelificante más usado debido a su grado de dureza que permite sostener los cultivos en su sitio y su inactividad iónica que permite el flujo de nutrientes del medio hacia los tejidos. El agar es una mezcla compleja de polisacáridos extraídos de algas rojas que se disuelve a 100 °C y solidifican a 45 °C, no es digerido por las enzimas vegetales y no reacciona con los componentes del medio.

Phytigel, es un polímero derivado de la fermentación de la bacteria "*Pseudomonas elodea*", de forma natural contiene cantidades significativas de potasio, sodio, calcio y

magnesio, aunque no perjudiciales y generalmente es más puro que el agar. Se utilizan proporciones de 0.2% a 0.4% (2 a 4 g L<sup>-1</sup>) (Pierik, 1997).

### 2.2.2 pH del medio

El pH del medio influye en la absorción de los ingredientes por parte del tejido en cultivo, en la solubilidad de las sales y en la eficacia de la gelificación del agar. El pH del medio suele fijarse en 5,8, ya que a este pH todas las sales se mantienen en una forma casi amortiguada (Bhojwani y Dantu, 2013).

### 2.2.3 Tipos de medios de cultivo

La mayoría de las formulaciones de medios de cultivo fueron desarrolladas en la década de los 1930's, y algunas formulaciones de uso más frecuente fueron desarrolladas en las décadas de los 1960's y 1970's, y difieren básicamente en la concentración de las sales.

#### 2.2.3.1 Medio MS (Murashige y Skoog)

El medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) fue creado por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en el año de 1962, la formulación es apta para la mayoría de las especies, es la más utilizada a nivel mundial en el cultivo de plantas o tejidos vegetales *in vitro* y se caracteriza por tener una alta concentración de sales (Bonga y Durzan, 1987).

### 2.2.3.2 Medio WPM (Woody Plant Medium)

Woody Plant Medium (WPM) o medio para plantas leñosas fue formulado por Lloyd y McCown en 1981. Desde entonces es ampliamente utilizado para la propagación de plantas leñosas. Su formulación se caracteriza por tener una baja concentración de sales (Bonga y Durzan, 1987) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Concentración de sales inorgánicas de los medios de cultivo MS Y WPM.

Ion	MS 50%	WPM 50%	MS-WPM 50%
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	10.305	2.47	12.775
K <sup>+</sup>	10.02	6.305	16.325
Ca <sup>++</sup>	1.495	1.5	2.995
Mg <sup>++</sup>	0.75	0.75	1.5
Mn <sup>++</sup>	0.066	0.066	0.132
Zn <sup>++</sup>	0.0145	0.015	0.0295
Na <sup>++</sup>	0.112	0.112	0.224
Fe <sup>++</sup>	0.05	0.05	0.1
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	19.7	4.82	24.52
SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0.88	3.72	4.6
PO <sub>4</sub>	0.625	0.625	1.25
BO <sub>3</sub> <sup>=</sup>	0.05	0.05	0.1
Cl <sup>-</sup>	3	0.655	3.655
Fe EDTA	0.055	0.055	0.11
Co <sup>++</sup>	0.0525		0.0525
Cu <sup>++</sup>	0.05	0.05	0.1
MoO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0.515	0.515	1.03
I <sup>-</sup>	2.5		2.5
Ni <sup>++</sup>			0
Total	47.125	21.195	68.32

Tomado por Bonga y Durzan, 1987.

## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó durante 2022-2023 en el Laboratorio de cultivos de tejidos vegetales, del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, ubicado en Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. La investigación consistió de dos experimentos independientes, cada uno descrito en forma de artículo científico: 1) Crecimiento de brotes de *Vaccinium corymbosum* en medios de cultivos con diferentes sales Inorgánicas y pH; 2) Sales inorgánicas y 2iP en medios de cultivos para proliferación de brotes de *Vaccinium corymbosum*.

El material vegetal fue plantas de arándano *Vaccinium corymbosum*, var. Biloxi, adquiridas a la empresa BIOTEC MARPA SPR DE RL DE CV®, en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán. La variedad Biloxi fue liberada en 1978 por la Universidad de Florida, a partir de esta fecha la propagación y el establecimiento de cultivos de arándano se extiende a zonas con menor latitud.

## CAPÍTULO IV

### CRECIMIENTO DE BROTES DE *Vaccinium corymbosum* EN MEDIOS DE CULTIVOS CON DIFERENTES SALES INORGÁNICAS Y pH

### SHOOT GROWTH OF *Vaccinium corymbosum* IN CULTURE MEDIA WITH DIFFERENT INORGANIC SALTS AND pH

#### 4.1 Resumen

Se evaluó la proliferación in vitro de brotes de *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi, en medios de cultivo que variaron en sales inorgánicas y niveles de pH. Segmentos de tallo de 2 cm de longitud que solo tenían yemas axilares, y otros segmentos tenían ápice y yemas axilares, se establecieron en medios de cultivo con sales inorgánicas WPM50% (Woody Plant Medium), MS50% (Murashige y Skoog) y la combinación MS50%-WPM50 % a diferentes niveles de pH (4.5, 5.0 y 5.5), y contenían 25 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0.4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina-HCL, 2 mg L<sup>-1</sup> 2iP, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 2 mg L<sup>-1</sup> de glicina, 5.7 g L<sup>-1</sup> agar. Se evaluaron las variables longitud de brote, número de hojas y número de brotes a los 40, 80 y 120 días de incubación. El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente aleatorio, con arreglo factorial 3x3x2. Los segmentos de tallo que se establecieron en medios de cultivo con sales inorgánicas MS50%-WPM50 % con niveles de pH 4.5 o 5.0, desarrollaron brotes axilares que fueron mayores en tamaño (5.5 y 5.8 cm) y número de hojas (11.5 y 11.8).

**Palabras clave:** Arándano, Cultivo de tejidos, WPM, MS.

## 4.2 Abstract

*In vitro* shoot proliferation of *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi, was evaluated in culture media that varied in inorganic salts and pH levels. Stem segments 2 cm long that had only axillary buds and other segments had apical and axillary buds were established on culture media with inorganic salts WPM50% (Woody Plant Medium), or MS50% (Murashige and Skoog) or the combination MS50%-WPM50%, at different pH levels (4.5, 5.0 and 5.5), and contained 25 g L<sup>-1</sup> sucrose, 100 mg L<sup>-1</sup> Myo-inositol, 0.4 mg L<sup>-1</sup> thiamine-HCL, 2 mg L<sup>-1</sup> 2iP, 0.5 mg L<sup>-1</sup> pyridoxine, 0.5 mg L<sup>-1</sup> nicotinic acid, 2 mg L<sup>-1</sup> glycine, 5.7 g L<sup>-1</sup> agar. The variables shoot length, number of leaves, and number of shoots were evaluated at 40, 80 and 120 days of incubation. The experiment was established according to a completely randomized design, with a 3x3x2 factorial arrangement. The stem segments that were established in culture media with inorganic salts MS50%-WPM50% with pH levels 4.5 or 5.0 developed axillary shoots that were larger in size (5.5 and 5.8 cm) and number of leaves (11.5 and 11.8).

**Keywords:** Blueberry, Tissue culture, WPM, MS.

## 4.3 Introducción

El cultivo de arándano *Vaccinium* spp. ha adquirido importancia a nivel mundial debido a su valor cultural, nutrimental y económico (Georgieva y Kondakova, 2021; Wang *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2018; Hine-Gómez y Abdelnour-Esquivel, 2013). Los principales países productores a nivel mundial son Estados Unidos, Canadá, Chile, Perú y España (USDA, 2021). México ocupa el sexto lugar en producción de arándano, y durante el año 2021 se produjeron 66,482 t. Las entidades federativas con mayor producción son Jalisco, Michoacán y Sinaloa (SIAP, 2022). Aunque no existen registros de la producción en Oaxaca, hay regiones que presentan condiciones edafológicas y climáticas apropiadas para el cultivo. Para asegurar su éxito productivo es necesario contar con productores locales de material vegetal que permitan establecer huertos comerciales con plantas que posean calidad genética, morfológica, fisiológica y fitosanitaria, dicho material se produce

utilizando la técnica de cultivos de tejidos vegetales que permite producir gran número de plántulas genéticamente uniformes y libre de patógenos. Para lo cual, es indispensable generar un protocolo de propagación vegetal masivo a partir de plantas madre u orteto de variedades exitosas en Oaxaca.

Los factores que influyen en el crecimiento y desarrollo *in vitro* de un explante son: el genotipo, condición sanitaria y fisiológica de la planta orteto, la composición del medio de cultivo y el ambiente de incubación (Bhojwani y Dantu, 2013; Greenway *et al.*, 2012). Los medios de cultivo están compuestos por agua, carbohidratos, reguladores de crecimiento, vitaminas y nutrimentos minerales esenciales específicos para cada especie vegetal y etapa de propagación (Greenway *et al.*, 2012; George y Klerk, 2008). La disponibilidad de los elementos esenciales es fundamental y está determinada por el pH y el potencial osmótico del medio que resulta de la fuente, concentración y la fuerza iónica total del medio de cultivo (Molinos da Silva *et al.*, 2004; Morard y Henry, 1998; Bonga y Durzan, 1987). El medio de cultivo para plantas leñosas Woody Plant Medium, WPM (Lloyd y McCown, 1981; Wolfe *et al.*, 1983) tiene baja concentración de iones ( $42.39 \text{ mM L}^{-1}$ ), y es de las formulaciones más utilizada en la propagación *in vitro* de arándano; sin embargo, el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), que su concentración de iones es de  $94.25 \text{ mM L}^{-1}$ , fue diseñado para cultivo de tejidos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L), se usa más frecuentemente porque ha demostrado ser eficiente para la obtención y multiplicación de diferentes especies (Martínez-Villegas *et al.*, 2015; George *et al.*, 2008): *Agave angustifolia* Haw, *A. potatorum* Zucc, *A. fourcroydes* Lem, *A. tequilana* Weber, *A. grijalvensis* B. Ullrich, *A. americana* var. *oaxacensis* Gentry (Enríquez-del Valle *et al.*, 2018), *Hylocereus monacanthus* (Lem) Britton & Rose (Montiel-Frausto *et al.*, 2016), *Laelia halbingeriana* Salazar & Soto Arenas (García-González *et al.*, 2020). El



arándano es considerado una planta calcífuga, ya que el nivel óptimo de crecimiento *in vitro* de brotes de arándano oscila a pH de 4.5 a 5.5 (Retamales y Hancock, 2012), mientras que para el cultivo *in vitro* de otras especies como: *Beaucarnea inermis* (S. Watson) Rose el pH del medio de cultivo es de 5.7 (Guillén *et al.*, 2015), y para *Persea americana* Mill (Ibarra-López *et al.*, 2016), *Agave potatorum* Zucc (Enríquez-del Valle *et al.*, 2016), *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto (López-Escamilla *et al.*, 2016), *Myrmecophila grandiflora* Walter Hood Fitch (Chavez-Cruz *et al.*, 2022), *Malus domestica* Borkh (Cabral-Miramontes *et al.*, 2022), se usan medios de cultivo con pH de 5.7 a 6.0. Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el crecimiento *in vitro* de brotes axilares de *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi, establecidos en medios de cultivo que variaron en formulación de sales inorgánicas MS50%, WPM50% y la combinación MS50%-WPM50%, a tres valores de pH (4.5, 5.0 y 5.5).

#### 4.4 Materiales y métodos

##### 4.4.1 Material vegetal

El presente estudio se realizó durante 2022-2023 en el Laboratorio de cultivos de tejidos vegetales, del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, ubicado en Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. Plantas micropropagadas de arándano *Vaccinium corymbosum*, var. biloxi fueron adquiridas a la empresa BIOTEC MARPA SPR DE RL DE CV®, en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán. Las plantas se establecieron en bolsas de polietileno negro de 30.8 dm<sup>3</sup>, en un sustrato que fue una mezcla de turba 35%, fibra de coco 35% y perlita 30%; se mantuvieron bajo sombra con malla al 35%, en donde

recibieron riegos con regadera manual y fertirriego una vez por semana con solución universal Steiner (Steiner, 1984).

#### 4.4.2 Establecimiento de cultivos asépticos

Para el establecimiento de cultivos *in vitro*, se preparó medio de cultivo con una mezcla de sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) y WPM (McCown y Lloyd, 1981) cada uno al 50% (Cuadro 2) (Bonga y Durzan, 1987)., complementado con 25 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 1.5 mg L<sup>-1</sup> de 2iP, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol, piridoxina 0.5 mg L<sup>-1</sup>, ácido nicotínico 0.5 mg L<sup>-1</sup>, glicina 2 mg L<sup>-1</sup>. El pH del medio se ajustó a 5, con HCl o NaOH 1 N, antes de agregar 5.7 g L<sup>-1</sup> de agar. El agar se disolvió y se distribuyeron 20 mL en cada frasco de vidrio de 145 cm<sup>3</sup>, se colocó una tapa de polipropileno. Los frascos con medio de cultivo se esterilizaron en autoclave a 1.2 kg cm<sup>-2</sup> de presión a 120 °C durante 17 min.

Cuadro 2. Composición mineral de tres soluciones nutritivas utilizadas en el cultivo *in vitro* de arándano.

Ion	MS	WPM	MS- WPM	Ion	MS	WPM	MS- WPM
	50%	50%	50%		50%	50%	50%
	Iones mE L <sup>-1</sup>				Iones mE L <sup>-1</sup>		
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	10.305	2.47	12.775	MoO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0.515	0.515	1.03
				Fe	0.055	0.055	0.11
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	19.7	4.82	24.52	EDTA <sup>=</sup>			
PO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0.625	0.625	1.25	Cl <sup>-</sup>	3	0.655	3.655
SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0.88	3.72	4.6	Na <sup>++</sup>	0.112	0.112	0.224
K <sup>+</sup>	10.02	6.305	16.325	BO <sub>3</sub> <sup>=</sup>	0.05	0.05	0.1
Ca <sup>++</sup>	1.495	1.5	2.995	Mn <sup>++</sup>	0.066	0.066	0.132
Mg <sup>++</sup>	0.75	0.75	1.5	Cu <sup>++</sup>	0.05	0.05	0.1
				Zn <sup>++</sup>	0.0145	0.015	0.0295
				Co <sup>++</sup>	0.0525	---	0.0525

				I <sup>-</sup>	2.5	---	2.5
				Ni <sup>++</sup>	---	---	---
<b>Total N</b>	<b>30.005</b>	<b>7.29</b>	<b>37.295</b>				
<b>Total</b>					<b>47.125</b>	<b>21.195</b>	<b>68.32</b>

Tomado por Bonga y Durzan, 1987.

Para el establecimiento de cultivos asépticos *in vitro*, de las plantas en vivero se seleccionaron ramas vigorosas y sanas, de las que se cortaron varetas de 10 cm de longitud, con ápice y yemas axilares; éstas se colocaron en bolsas de polietileno para su transporte al laboratorio, en donde se cortaron en segmentos de 5 cm de longitud, se colocaron en un recipiente de vidrio de 9 cm de altura y 7 cm de diámetro, para someterlas a desinfección superficial que consistió en lavado en agua con 0.5% p/v detergente y se enjuagaron con agua potable; posteriormente se sumergieron durante 15 min en una solución al 0.3% de hipoclorito de sodio, seguido de tres enjuagues con agua esterilizada, este último paso se realizó en la campana de aire filtrado de flujo laminar horizontal. Los segmentos de tallo con yemas axilares se colocaron en cajas Petri de vidrio (10×100 mm), esterilizadas, y se cortaron segmentos de 3 cm<sup>3</sup>, con una o dos yemas axilares, para establecer dos explantes por frasco de cultivo de 145 cm<sup>3</sup> que contenían 20 mL de medio de cultivo. Los explantes se incubaron por 60 días en un intervalo de temperatura de 15-28 °C, bajo iluminación LED 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, en fotoperiodos de 16/8 h luz/oscuridad.

#### 4.4.3 Fase experimental

Los cultivos asépticos *in vitro* de brotes desarrollados de yemas axilares se utilizaron para establecer el experimento. Se prepararon nueve variantes de medios de cultivo que

contenían: 1) 25 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0.4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina-HCL, 2 mg L<sup>-1</sup> 2iP, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 2 mg L<sup>-1</sup> de glicina. 2) Alguna formulación de sales minerales, ya sea MS50% o la formulación WPM50%, o la combinación de sales minerales MS50%-WPM50%. El volumen total de cada variante de sales minerales se dividió en tres para ajustarlos a diferentes niveles de pH (4.5, 5.0 y 5.5), se agregaron 5.7 g L<sup>-1</sup> de agar y se distribuyeron 20 mL de medio de cultivo a cada frasco de vidrio de 145 cm, se colocó la tapa de polipropileno y se esterizaron en autoclave durante 17 min a 120 °C y 1.2 kg cm<sup>-2</sup> de presión. En condiciones asépticas proporcionadas por la campana de aire filtrado de flujo laminar horizontal, el uso de pinzas de disección y bisturí esterilizadas, los brotes se extrajeron del recipiente de cultivo y colocaron en cajas Petri de vidrio esterilizadas, para córtalos en segmentos de 2 cm. Algunos segmentos de tallo tenían solo yemas axilares, mientras que otros segmentos tenían el ápice y yemas axilares. Se establecieron dos segmentos de tallo en cada frasco de vidrio, con alguna de las nueve variantes de medio de cultivo para promover el desarrollo de brotes. Uno de los segmentos tenía solo yemas axilares y el otro segmento con el ápice y yemas axilares: Los segmentos de tallo en posición vertical y con el tercio inferior insertado en el medio de cultivo gelificado. Después de establecer los segmentos de tallo en el medio de cultivo, se colocó nuevamente la tapa y se selló con polietileno adherente, para entonces incubarlos durante 90 días, en condiciones de 15-28 °C, e iluminación LED 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, en fotoperiodos de 16/8 h luz/oscuridad.

#### 4.4.4 Manejo y análisis de datos

El experimento se estableció de acuerdo con un diseño completamente aleatorio, con arreglo factorial  $3 \times 3 \times 2$ , tres niveles del factor sales minerales MS50%, WPM50% y la combinación MS50%-WPM50%, tres niveles del factor pH 4.5, 5.0 y 5.5 y dos niveles del factor tipo de segmento de tallo axilar o apical, por lo que se tuvieron 18 tratamientos. La unidad experimental fue un segmento de tallo, y se tuvieron ocho repeticiones por tratamiento.

#### 4.4.5 Variables a evaluar

Cuarenta días después del establecimiento del experimento se realizó la primera medición, y posteriormente a los 80 y 120 días, en el periodo noviembre 2022 a enero 2023, en que se cuantificó: longitud de brote (cm), obtenida con una regla graduada; número de hojas y número de brotes. A los datos se les verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los errores mediante las pruebas de Shapiro Wilks y Bartlett ( $\alpha \leq 0.05$ ), las variables que no cumplieron estos supuestos se transformaron a  $(x+1)^{0.5}$ . Los datos de variables morfológicas y de crecimiento se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias (Duncan, 0.05). Las rutinas de los análisis estadísticos se realizaron con el programa computacional Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute Inc., 2014).

## 4.5 Resultados y discusión

En la etapa de establecimiento de cultivos asépticos, el 40% de los segmentos de tallo que se establecieron fueron asépticos y viables, los cuales desarrollaron brotes axilares que se usaron para la etapa de multiplicación de propágulos (Figura 1).

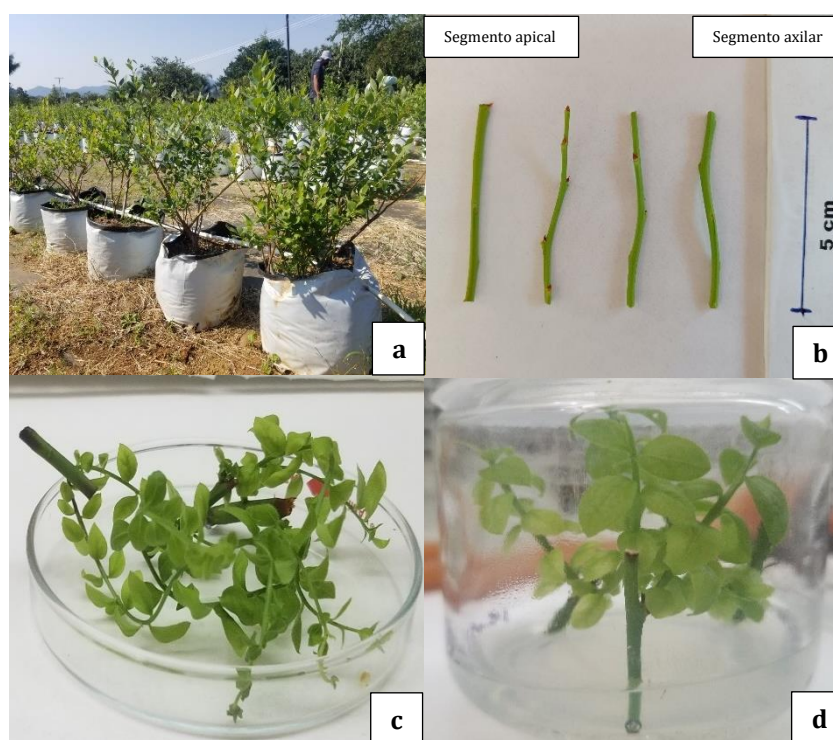


Figura 1. Proceso de propagación *in vitro* de plantas de arándano. a) Planta orteto, b) segmentos de tallo apicales y axilares, c) segmento de tallo cultivado *in vitro* con nuevos brotes axilares, d) brotes axilares obtenidos *in vitro* colocados en caja petri para cortarlos en segmentos con yemas axilares, y establecerlos en medio de cultivo para la multiplicación de propágulos.

En la fase experimental, los análisis de varianza mostraron que los tipos de sales inorgánicas en el medio de cultivo (MC) tuvieron efectos diferentes altamente significativos ( $P \leq 0.01$ ) en la longitud de brote a los 40, 80 y 120 días de incubación;

efectos diferentes significativos ( $P \leq 0.05$ ) en el número de brotes a los 40 días; y a los 80 días mostró alta significancia ( $P \leq 0.01$ ). Los niveles del factor tipo segmento de tallo tuvieron efecto diferente altamente significativos ( $P \leq 0.01$ ) en el número de brotes a los 40, 80 y 120 días. La interacción MCxpH mostró efectos altamente significativos en el número de hojas a los 40 días, y efectos significativos en la longitud de brote en las tres fechas, número de hojas a los 80 días y número de brotes a los 40 y 80 días (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resumen de nueve análisis de varianza del desarrollo *in vitro* de brotes de *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi a partir de yemas axilares o ápicas establecidos en medios de cultivo que variaron en tipo de sales minerales y pH.

Variables	GL	Cuadrados medios							
		MC	pH	ST	MCxpH	MCxST	pHxST	MCxpHxST	Error
TLB40	17	1.91**	1.01*	0.44 <sup>ns</sup>	0.66*	0.14 <sup>ns</sup>	0.19 <sup>ns</sup>	0.08 <sup>ns</sup>	0.26
TLB80	17	2.58**	1.22 <sup>ns</sup>	0.56 <sup>ns</sup>	1.05*	0.19 <sup>ns</sup>	0.13 <sup>ns</sup>	0.10 <sup>ns</sup>	0.43
TLB120	17	4.10**	1.10 <sup>ns</sup>	0.29 <sup>ns</sup>	1.65*	0.40 <sup>ns</sup>	1.11 <sup>ns</sup>	0.62 <sup>ns</sup>	0.58
TNH40	17	0.33 <sup>ns</sup>	1.14 <sup>ns</sup>	2.89*	2.13**	0.34 <sup>ns</sup>	0.41 <sup>ns</sup>	0.70 <sup>ns</sup>	0.64
TNH80	17	1.08 <sup>ns</sup>	2.28 <sup>ns</sup>	1.33 <sup>ns</sup>	3.09*	0.40 <sup>ns</sup>	0.62 <sup>ns</sup>	0.90 <sup>ns</sup>	1.15
TNH120	17	1.72 <sup>ns</sup>	2.03 <sup>ns</sup>	0.41 <sup>ns</sup>	1.89 <sup>ns</sup>	0.93 <sup>ns</sup>	2.84 <sup>ns</sup>	1.20 <sup>ns</sup>	1.53
TNB40	17	0.70*	0.49 <sup>ns</sup>	25.92**	0.51*	0.47 <sup>ns</sup>	0.04 <sup>ns</sup>	0.20 <sup>ns</sup>	0.17
TNB80	17	1.21**	0.25 <sup>ns</sup>	16.26**	0.62*	0.81*	0.02 <sup>ns</sup>	0.25 <sup>ns</sup>	0.21
TNB120	17	0.21 <sup>ns</sup>	0.52 <sup>ns</sup>	9.16**	0.24 <sup>ns</sup>	0.59 <sup>ns</sup>	0.18 <sup>ns</sup>	0.31 <sup>ns</sup>	0.31

GL= grados de libertad; MC= medio de cultivo; pH= potencial de hidrogeno; ST= segmento de tallo; TLB= longitud de brote transformada a los 40, 80 y 120 días (datos transformados); TNH= número de hojas a los 40, 80 y 120 días (datos transformados); TNB= número de brotes a los 40, 80 y 120 días (datos transformados), MCxpH, MCxST, pHxST, MCxpHxST= interacciones. ns= valor de F no significativo ( $P > 0.05$ ); \*= valor de F significativo ( $P \leq 0.05$ ); \*\*= valor de F altamente significativo ( $P \leq 0.01$ ).

Los segmentos de tallo con yemas axilares y los segmentos con ápice y yemas axilares tenían 2 cm de tamaño cuando se establecieron en medios de cultivo con las sales minerales WPM50%, MS50% y MS50%-WPM50%, y en el transcurso de 120 días desarrollaron brotes que tuvieron diferentes tamaños, número de hojas y de brotes. A los 120 días de incubación en los segmentos de tallo que se establecieron en medio de

cultivo con las sales minerales MS50%- WP50% con pH 4.5 o 5.0 desarrollaron en promedio 1.4 y 1.3 brotes, de 5.5 y 5.8 cm de altura y con 11.5 y 11.8 hojas, respectivamente; magnitudes significativamente mayores (Duncan, 0.05) a los 0.8 nuevos brotes, de 1.6 cm de altura y con 7.8 hojas que desarrollaron a partir de los segmentos de tallo que se establecieron en medios de cultivo con sales inorgánicas WPM50% con pH 5.5. Para el crecimiento de brotes de arándano, el tipo de sales inorgánicas y el nivel de pH fueron condiciones importantes para el desarrollo de brotes. La mejor condición para el desarrollo de brotes fue la mezcla de sales inorgánicas MS50%-WPM50% y valores de pH en el intervalo de 4.5 a 5.

Los segmentos de tallo con el ápice mantuvieron su dominancia apical, ya que en pocos de estos segmentos ocurrió la brotación de yemas axilares, por lo que el brote principal continuó creciendo y solo desarrollaron en promedio 0.55 brotes axilares, mientras que en los segmentos de tallo que tenían solo yemas axilares, de 1 a 2 yemas brotaron, con un promedio 1.25 brotes. El tipo de segmento de tallo, apical o axilar, no determinó el nivel de crecimiento de los brotes, en las diversas condiciones de sales minerales y pH. Cuando los datos se ordenaron en función del tipo de explanto que se estableció, aquellos segmentos de tallo que inicialmente tenían yemas axilares y los segmentos de tallo que tenían el ápice, cuando habían transcurrido 40 días de incubación, tenían respectivamente 1.3 y 0.3 nuevos brotes, con 7.5 y 6.1 hojas, que en cada caso fueron significativamente (Duncan, 0.05) diferentes. Los brotes tuvieron 2.5 y 2.2 cm de altura, no estadísticamente (Duncan, 0.05) diferentes. Cuando transcurrieron 120 días, los brotes que desarrollaron de estos explantos ya tenían 3.2 y 3.4 cm de altura con 9.1 y 9.3 hojas. Cuando los datos se ordenaron en función de las sales inorgánicas que se usaron



en el medio de cultivo, a los 120 días de incubación, los brotes que se establecieron en el medio de cultivo con la mezcla MS50%-WPM 50%, tuvieron en promedio 1.1 brotes, con el brote mayor de 4.7 cm de longitud, y 10.2 hojas totales (Cuadro 4).

Cuadro 4. Características de los brotes *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi cultivados *in vitro* a los 40, 80 y 120 días de incubación, en función de los niveles de los factores.

Fact Var	ST		WPM	MC		5.5	pH	
	Axilar	Apical		MS	MS-WPM		5.0	4.5
LB40	2.5±0.2 <sup>a</sup>	2.2±0.2 <sup>a</sup>	1.7±0.1 <sup>c</sup>	2.4±0.2 <sup>b</sup>	3.0±0.2 <sup>a</sup>	2±0.2 <sup>b</sup>	2.5±0.2 <sup>ab</sup>	2.7±0.2 <sup>a</sup>
LB80	3.2±0.2 <sup>a</sup>	2.8±0.2 <sup>a</sup>	2.1±0.2 <sup>b</sup>	3.2±0.3 <sup>a</sup>	3.7±0.3 <sup>a</sup>	2.59±0.3 <sup>a</sup>	3.2±0.3 <sup>a</sup>	3.3±0.3 <sup>a</sup>
LB120	3.2±0.3 <sup>a</sup>	3.4±0.4 <sup>a</sup>	2.1±0.2 <sup>c</sup>	3.3±0.4 <sup>b</sup>	4.7±0.5 <sup>a</sup>	2.90±0.4 <sup>a</sup>	3.7±0.5 <sup>a</sup>	3.4±0.4 <sup>a</sup>
NH40	7.5±0.4 <sup>a</sup>	6.1±0.4 <sup>b</sup>	6.4±0.5 <sup>a</sup>	7.0±0.5 <sup>a</sup>	7.1±0.5 <sup>a</sup>	6.37±0.6 <sup>a</sup>	6.7±0.4 <sup>a</sup>	7.4±0.5 <sup>a</sup>
NH80	9.2±0.5 <sup>a</sup>	8.2±0.6 <sup>a</sup>	7.8±0.8 <sup>a</sup>	9.1±0.7 <sup>a</sup>	9.3±0.7 <sup>a</sup>	7.85±0.8 <sup>a</sup>	9.0±0.6 <sup>a</sup>	9.3±0.7 <sup>a</sup>
NH120	9.1±0.7 <sup>a</sup>	9.3±0.7 <sup>a</sup>	8.6±0.8 <sup>a</sup>	8.9±1.0 <sup>a</sup>	10.2±0.8 <sup>a</sup>	8.5±1.0 <sup>a</sup>	10.0±0.8 <sup>a</sup>	9.1±0.8 <sup>a</sup>
NB40	1.3±0.1 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>b</sup>	0.6±0.1 <sup>b</sup>	0.9±0.1 <sup>a</sup>	1.0±0.2 <sup>a</sup>	0.7±0.1 <sup>b</sup>	0.8±0.1 <sup>b</sup>	1.1±0.2 <sup>a</sup>
NB80	1.3±0.1 <sup>a</sup>	0.4±0.1 <sup>b</sup>	0.5±0.1 <sup>b</sup>	1.0±0.2 <sup>a</sup>	1.0±0.2 <sup>a</sup>	0.7±0.1 <sup>b</sup>	0.9±0.1 <sup>ab</sup>	1.0±0.2 <sup>a</sup>
NB120	1.3±0.1 <sup>a</sup>	0.6±0.1 <sup>b</sup>	0.8±0.1 <sup>a</sup>	0.8±0.2 <sup>a</sup>	1.1±0.2 <sup>a</sup>	0.7±0.1 <sup>b</sup>	0.9±0.2 <sup>ab</sup>	1.1±0.2 <sup>a</sup>

ST= segmento de tallo; MC= medio de cultivo; WPM= Woody Plant Medium (Lloyd y McCown, 1981); MS= Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962); MS-WPM= de sales inorgánicas MS50% y WPM50%; pH= nivel de pH. LB= longitud de brote (cm) a los 40, 80 y 120 días; NH= número de hoja a los 40, 80 y 120 días; NB= número de brote a los 40, 80 y 120 días.

Medias con la misma letra en las filas y los niveles del factor no son significativamente diferentes (Duncan,  $P \leq 0.05$ ); media  $\pm$  error estándar.

Los brotes que desarrollaron a partir de los segmentos de tallo apical y axilar que se establecieron en medios de cultivo con la combinación de sales inorgánicas MS50%-WPM50% a nivel de pH 5.0 y 4.5 formaron 3.6 y 3.8 cm a los 40 días, así como 8 y 6.4 cm a los 120 días, valores que son dos y cinco veces mayores a los brotes axilares que desarrollaron en segmentos de tallo que estuvieron en el tratamiento AWPM50% con pH 5.5.

Los brotes axilares que desarrollaron en los medios de cultivo PM50%-W50% pH 5.0 y AM50%-W50% con pH 4.5 tuvieron en promedio 7.8 y 9.3 hojas a los 40 y 80 días de

incubación, así como 13.7 y 12.6 hojas; respectivamente, cantidades que fueron dos veces a la cantidad de hojas que tuvieron los brotes que desarrollaron en medios de cultivo con sales inorgánicas PWPM50% con pH 5.5.

A partir de los segmentos de tallo con yemas axilares establecidos en medios de cultivo con la combinación de sales inorgánicas MS50%-WPM50% a pH 4.5, desarrollaron en promedio 2.2 y 2.1 brotes a los 40 y 80 días de incubación, cantidad que fue diez veces la cantidad de número de brotes que desarrollaron a partir los segmentos apicales establecidos en medios de cultivo con sales inorgánicas WPM50% con pH 5.0 y 5.5 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Desarrollo de brotes de arándano en medios de cultivo con diferentes condiciones de sales inorgánicas y pH.

Var. Trat.	LB40	LB120	NH40	NH120	NB40	NB120
PM-W5.0	3.6±1.4 <sup>ab</sup>	7.8±2.7 <sup>a</sup>	7.8±2.0 <sup>a</sup>	13.7±1.8 <sup>a</sup>	0.6±0.9 <sup>bcd</sup>	0.8±1.1 <sup>ab</sup>
AM-W4.5	3.8±1.3 <sup>a</sup>	6.4±1.2 <sup>ab</sup>	9.3±2.7 <sup>a</sup>	12.6±2.9 <sup>a</sup>	2.2±1.1 <sup>a</sup>	2.1±0.9 <sup>a</sup>
PM-W4.5	3.5±0.7 <sup>ab</sup>	4.6±1.6 <sup>abc</sup>	8.1±2.7 <sup>a</sup>	10.3±3.4 <sup>a</sup>	0.3±0.7 <sup>bcd</sup>	0.6±0.8 <sup>ab</sup>
AMS5.5	2.6±1.4 <sup>ab</sup>	4.6±2.4 <sup>abc</sup>	7.6±2.9 <sup>a</sup>	11.3±6.2 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>abcd</sup>	1.0±0.6 <sup>ab</sup>
AM-W5.0	2.9±1.3 <sup>ab</sup>	4.4±2.9 <sup>abc</sup>	6.3±2.5 <sup>a</sup>	10.5±4.5 <sup>a</sup>	1.6±1.0 <sup>ab</sup>	1.6±1.2 <sup>ab</sup>
PMS5.0	1.8±1.2 <sup>ab</sup>	3.9±2.5 <sup>abc</sup>	4.0±2.1 <sup>a</sup>	9.6±5.4 <sup>a</sup>	0.1±0.3 <sup>cd</sup>	0.6±0.8 <sup>ab</sup>
PMS5.5	1.8±1.4 <sup>ab</sup>	3.7±3.3 <sup>abc</sup>	6.8±3.5 <sup>a</sup>	9.0±7.9 <sup>a</sup>	0.3±0.5 <sup>bcd</sup>	0.3±0.5 <sup>ab</sup>
PM-W5.5	1.7±1.5 <sup>ab</sup>	3.2±3.1 <sup>abc</sup>	4.0±3.1 <sup>a</sup>	7.1±4.9 <sup>a</sup>	0.1±0.3 <sup>cd</sup>	0.1±0.4 <sup>b</sup>
PMS4.5	2.5±1.1 <sup>ab</sup>	3.0±1.3 <sup>abc</sup>	6.3±3.2 <sup>a</sup>	10.0±5.4 <sup>a</sup>	1.3±1.8 <sup>abc</sup>	1.0±1.5 <sup>ab</sup>
PWPM5.0	1.7±0.8 <sup>ab</sup>	2.7±1.1 <sup>bc</sup>	7.2±3.1 <sup>a</sup>	11.1±4.6 <sup>a</sup>	0±0 <sup>d</sup>	0.1±0.4 <sup>b</sup>
AWPM4.5	1.7±1.0 <sup>ab</sup>	2.5±1.4 <sup>bc</sup>	5.7±3.3 <sup>a</sup>	7.8±4.3 <sup>a</sup>	1.0±0.5 <sup>abcd</sup>	0.8±0.4 <sup>ab</sup>
AM-W5.5	2.4±1.6 <sup>ab</sup>	2.4±2.0 <sup>bc</sup>	6.7±4.3 <sup>a</sup>	7.8±6.5 <sup>a</sup>	1.1±0.6 <sup>abcd</sup>	1.0±0.8 <sup>ab</sup>
AMS5.0	2.9±1.5 <sup>ab</sup>	2.3±2.3 <sup>bc</sup>	7.8±3.4 <sup>a</sup>	7.5±6.5 <sup>a</sup>	0.8±0.3 <sup>bcd</sup>	0.6±0.5 <sup>ab</sup>
AWPM5.0	1.6±1.1 <sup>ab</sup>	2.0±1.5 <sup>bc</sup>	6.8±3.2 <sup>a</sup>	8.6±4.3 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>abcd</sup>	1.5±0.5 <sup>ab</sup>
AMS4.5	2.7±0.9 <sup>ab</sup>	1.9±2.3 <sup>bc</sup>	9.3±3.0 <sup>a</sup>	5.6±6.8 <sup>a</sup>	1.5±0.7 <sup>ab</sup>	1.1±1.1 <sup>ab</sup>
AWPM5.5	1.8±0.8 <sup>ab</sup>	1.9±0.9 <sup>c</sup>	7.6±2.8 <sup>a</sup>	9.5±3.9 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>abcd</sup>	1.3±0.5 <sup>ab</sup>
PWPM4.5	1.5±0.9 <sup>b</sup>	1.8±1.4 <sup>c</sup>	5.2±3.0 <sup>a</sup>	8.0±4.6 <sup>a</sup>	0.1±0.3 <sup>cd</sup>	1.0±1.5 <sup>ab</sup>
PWPM5.5	1.5±1.2 <sup>b</sup>	1.3±1.5 <sup>c</sup>	5.3±5.6 <sup>a</sup>	6.1±7.2 <sup>a</sup>	0±0 <sup>d</sup>	0.1±0.4 <sup>b</sup>

LB= longitud de brote (cm) a los 40 y 120 días; NH= número de hoja a los 40 y 120 días; NB= número de brote a los 40 y 120 días. PM-W5.0= apical+ combinación MS50%-WPM50%+ pH 5.0; AM-W4.5= axilar+ combinación MS50%-WPM50%+ pH 4.5; PM-W4.5= apical+ combinación MS50%-WPM50%+ pH 4.5; AMS5.5= axilar+ MS50%+ pH

5.5; AM-W5.0= axilar+ combinación MS50%-WPM50%+ pH 5.0; PMS5.0= apical+ MS50%+ pH 5.0; PMS5.5= apical+ MS50%+ pH 5.5; PM-W5.5= apical+ combinación MS50%-WPM50%+ pH 5.5; PMS4.5= apical+ MS50%+ pH 4.5; PWPM5.0= apical+ WPM50%+ pH 5.0; AWPM4.5= axilar+ WPM50%+ pH 4.5; AM-W5.5= axilar+ combinación MS50%-WPM50%+ pH 5.5; AMS5.0= axilar+ MS50%+ pH 5.0; AWPM5.0= axillar+ WPM50%+ pH 5.0; AMS4.5= axilar+ MS50%+ pH 4.5; AWPM5.5= axilar+ WPM50%+ pH 5.5; PWPM4.5= apical+ WPM50%+ pH 4.5; PWPM5.5= apical+ WPM50%+ pH 5.

Los resultados en el presente trabajo muestran la posibilidad de propagar *in vitro* arándano *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi, a partir de segmentos de tallo que se obtuvieron de plantas madre en condiciones de vivero. El crecimiento de los brotes en altura y su cantidad de hojas es importante, ya que en la base de cada hoja se tiene una yema axilar, que con fines de propagación es posible obtener nuevos brotes, que determinan un factor de incremento en cada ciclo de multiplicación de propágulos *in vitro*. Suponiendo que, en cada ciclo de repicado, que se realizase en periodos de cada dos meses, cortando el material vegetal en segmentos de 2 cm de longitud conteniendo 3 hojas y yemas axilares en promedio, en el transcurso de un año se podrían tener cinco ciclos de propagación de propágulos, que después de un año se tendrían 283 plantas derivadas de cada segmento de tallo inicial.

En el cultivo *in vitro* de arándano se tienen referencias del uso de diversas formulaciones de sales minerales (WPM; MS; W-M; B5; MO; White, Anderson) con fines de propagación (Wang *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2018; Tetsumura *et al.*, 2012; Ružić *et al.*, 2000), sin embargo en este estudio, obtuvimos el crecimiento de brotes, este ocurrió en los medios de cultivo con la mezcla MS50%-WPM50%, tiene mayor cantidad de macro y micronutrientes minerales, el total de iones es 68.32 mEq L<sup>-1</sup>, cantidad que es 1.45 veces que el MS50% (47.125 mEq L<sup>-1</sup>) y 3.22 veces que el WPM50% (21.195 mEq L<sup>-1</sup>),

otra diferencia entre los medios utilizados, fue que la formulación WPM no contiene los iones  $I^-$  y  $Co^{++}$  y tanto la formulación MS como WPM no presentan iones  $Ni^{++}$ ; Ramage y Williams (2002), señalan que los nutrientes minerales constituyen un componente importante de los medios de cultivo, pero a menudo se pasan por alto como elicitores morfogénicos.

Tetsamura *et al.* (2008), evaluó cuatro genotipos de arándanos en medios de cultivo WPM, MS y la combinación MS-WPM, los resultados fueron similares a los obtenidos en el presente estudio, ya que se determinó que la combinación de los MS50%-WPM50% fue la mejor condición para el crecimiento de brotes en la etapa de multiplicación de propágulos; sin embargo, Wang *et al.* (2019), reportó que el medio de cultivo de oliva complementado con  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  Zeatina;  $2,0 \text{ mg-L}^{-1}$  ácido naftalenacético, NAA, y  $0,05 \text{ mg-L}^{-1}$  kinetina, KT, aumentó el coeficiente de proliferación de brotes *in vitro* del arándano highbush en 60 días.

Los mejores resultados se obtuvieron en tratamientos que presentaban un intervalo en los niveles de pH de 4.5-5.0, mostró el mejor resultado; Ostrolucká *et al.* (2004), observaron para el cultivo *in vitro* de brotes de arándano (*V. corymbosum* y *virgatum*) variedad 'Berkeley', 'Bluecrop', 'Earliblue, y O'Neal', existe una relación en la proliferación de brotes y el pH, ya que la mayor respuesta de multiplicación de propágulos se obtuvo en medio de cultivo con pH 5.0.

#### 4.6 Conclusiones

A partir de segmentos de tallo de plantas de arándano en vivero, fue posible establecer con 40% de éxito cultivos asépticos *in vitro* de segmentos de tallo de arándano, en los

que desarrollaron brotes axilares. El medio de cultivo con sales inorgánicas MS50%-WPM50 % y nivel de pH 4.5-5.0, proporcionó las mejores condiciones para el crecimiento de los brotes de arándano.

#### 4.7 Referencias bibliográficas

1. Bonga, J. M., D. J. Durzan. 1987. Cell and Tissue Culture in Forestry. Volumen 1: General Principles and Biotechnology. Springer-Science +Business Media. Dordrecht. 422 p. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-0994-1>
2. Bhojwani, S. S., P. K. Dantu. 2013. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer. New Delhi, India. 309 p. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
3. Cabral-Miramontes, J. P., J. A. Chávez-Simental, C. Pulido-Díaz, M. González-Portillo, J. R. Goche-Télles & V. M. Barragán-Hernández. 2022. Propagación in vitro de manzano a partir de embriones cigóticos maduros. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 13(4), 603–616. <https://doi.org/org/10.29312/remexca.v13i4.2164>
4. Chavez-Cruz, I. L., J. R. Enríquez-del Valle, E. Hernández-Santiago & G. Rodríguez-Ortiz. 2022. Sales minerales y reguladores de crecimiento en medios de cultivo para desarrollo de *Myrmecophila grandiflora*. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 9(S1), 108–116. . (Consultado: 29/05/2023). Disponible en: <https://rmae.voaxaca.tecnm.mx/volumen-9-s-2/>
5. Chen, H. Y., Liu, J., Pan, C., Yu, J. W., & Wang, Q. C. 2018. In vitro regeneration of adventitious buds from leaf explants and their subsequent cryopreservation in highbush blueberry. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 134(2), 193–204. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1412-y>
6. Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., Ruiz Luna, J., Pacheco-Ramírez, A. J., & Vásquez-Vásquez, L. 2018. Crecimiento y condición nutrimental de plantas micropropagadas de *Agave angustifolia* abonadas y fertirrigadas en vivero. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 5(2), 106–115. . (Consultado: 29/05/2023). Disponible en: [https://rmae.voaxaca.tecnm.mx/wp-content/uploads/2020/11/4-2018\\_RMAE-28-Agave-to-edit.pdf](https://rmae.voaxaca.tecnm.mx/wp-content/uploads/2020/11/4-2018_RMAE-28-Agave-to-edit.pdf)
7. García-González, R., J. R. Enríquez-del Valle, G. Rodríguez-Ortiz, G. V. Campos-Angeles, E. A. Pérez-García & J. Ruiz-Luna. 2020. Mineral salts and growth regulators for micropropagation of *Laelia halbingeriana* Salazar & Soto Arenas. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 47(2), 105–116. <https://doi.org/10.7764/ijanr.v47i2.2086>

8. George, E. F.; G. J. D. Klerk. 2008. Chapter 3: The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro-and Micro-Nutrients. *In* George, E. F., M. A. Hall and G.J. De Klerk (Eds). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht. pp. 65–113 [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_3)
9. Georgieva, M. & Kondakova, V. 2021. *In vitro* propagation of *Vaccinium corymbosum* L. *Bulgarian Journal of Agricultural Science.*, 27 (2), 323–327. (Consultado: 25/05/2023). Disponible en: Available at: <https://www.agrojournal.org/27/02-11.pdf>
10. Greenway, M. B., Phillips, I. C., Lloyd, M. N., Hubstenberger, J. F., & Phillips, G. C. 2012. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 48(4), 403–410. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9452-1>
11. Guillén, S., Martínez-Palacios, A., Martínez, H., & Martínez-Ávalos, J. G. 2015. Organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis* (Asparagaceae), una especie amenazada del noreste de México. *Botanical Sciences*, 93(2), 221–230. <https://doi.org/org/10.17129/botsci.129>
12. Hine-Gómez, A., & Abdelnour-Esquivel, A. 2013. *In vitro* establishment of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L). *Tecnología En Marcha*, 26(4), 64–71. <https://doi.org/org/10.18845/tm.v26i4.1584>
13. Ibarra-López, A., M. C. Ojeda-Zacarías, E. A. García-Zambrano & A. Gutiérrez-Diez. 2016. Inducción *in vitro* de brotes de dos cultivares de aguacate raza Mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* Schltl. & Cham. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(2), 337–347. <https://doi.org/org/10.29312/remexca.v7i2.348>
14. Martínez-Villegas, Y. M., M. Andrade-Rodríguez, M. T. Colinas-León, O. G. Villegas-Torres, A. Castillo-Gutiérrez & I. Alia-Tejacal. 2015. Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pasquita (*Euphorbia leucocephala* Losty). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 38(4) 369– 374. (Consultado: 29/05/2023). Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v38n4/v38n4a4.pdf>
15. Molinos-da Silva, C., A. Villegas-Monter, P. Sánchez-García, G. Alcántar-González, M. N. Rodríguez-Mendoza y L. M. Ruiz-Posadas 2004, "Efecto del potencial osmótico y contenido de CA en el medio de cultivo sobre la distribución de CA<sup>2+</sup> Y K<sup>+</sup>, producción de biomasa y necrosis apical de VID R110." *Interciencia*, 29(7), 384-388. (Consultado: 25/05/2023). Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33909407>
16. Montiel-Frausto, L. B., J. R. Enríquez-del Valle & A. Cisneros. 2016. Propagación *in vitro* de *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Brittony Rose. *Biotechnología Vegetal*, 16(2), 113–123. (Consultado: 29/05/2023). Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/516/pdf>

17. Morard P. and M. Henry. 1998. Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. *Journal of Plant Nutrition* 21:565-1576. <https://doi.org/10.1080/01904169809365504>
18. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473–479. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
19. López-Escamilla, A. L., M. López-Herrera & C. Loaiza-Alanís. 2016. Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* link Et Otto (Cactaceae). *Polibotánica*, 0(42), 153–166. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.42.8>
20. Lloyd, G., McCown, B., 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30, 421–427.
21. Ostrolucká MG, Libiaková G, Ondrušková E, Gajdošová A. 2004. *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis Biology* 676: 207-676.
22. Ramage, C. M. y R. R. Williams. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant.* 38, 116-124. <https://doi.org/10.1079/IVP2001269>
23. Retamales, J. B. & J. F. Hancock. 2012. Blueberries. 2 ed. Ed. CABI, Boston, MA., USA. 393 p. (Consultado: 29/05/2023). Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=eVloDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=Retamales,+J.B.,+Hancock,+J.F.,+2018.+Blueberries,+2+ed.+CABI,+Boston,+MA.&ots=ar5OnezzaZ&sig=6J2o91bMUJ0niZvX7HHwR2AbdKE#v=onepage&q=Retamales%2C%20J.B.%2C%20Hancock%2C%20J.F.%2C%202018.%20Blueberries%2C%202%20ed.%20CABI%2C%20Boston%2C%20MA.&f=false>
24. SAS Institute Inc. 2014. Programming with Base SAS ® 9.4, Second Edition. SAS Institute. Cary, NC. USA. 900 p.
25. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2022. *Panorama agroalimentario 2022*. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. CDMX. (Consultado: 24/05/2023). Disponible en: [https://www.gob.mx/siap/es/archivo/acciones\\_y\\_programas](https://www.gob.mx/siap/es/archivo/acciones_y_programas).
26. Steiner, A. A. (1984). The universal nutrient solution. *In: Proc. Sixth International Congress on Soilles Culture. International Soc. Soilless Culture. The Netherlands.* pp:633- 647.
27. Tetsumura T, Matsumoto Y, Sato M, Honsho C, Yamashita K, Komatsu H, Sugimoto Y, Kunitake H. 2008. Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae* 119: 72-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.06.028>

28. U.S. Department of Agriculture (USDA). 2021. *Blueberries Around the Globe-Past, Present, and Future*. United States Department of Agriculture. (Consultado: 24/05/2023). Disponible en: <https://www.fas.usda.gov/data/blueberries-around-globe-past-present-and-future>
29. Wang, Y., Dong, X., Huang, H.-Y., & Wang, Y.-Z. 2019. Establishment of efficient adventitious shoots induction system and *ex vitro* rooting in *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae). *Botanical Sciences*, 97(2), 180-191. <https://doi.org/10.17129/botsci.2135>
30. Wolfe, D.E., Eck, P., Chin, C.-K., 1983. Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry. *HortScience* 18, 703–705. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.18.5.703>
31. Zárate, N. B., Yescas, A. A., & Morales, D. V. J. (2017). Manejó agronómico del cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en la Sierra Norte de Oaxaca. *Universidad & Ciencia*, 6, 138–155. <http://revistas.unica.cu/uciencia>



## CAPÍTULO V

### SALES INORGÁNICAS Y 2iP EN MEDIOS DE CULTIVOS PARA PROLIFERACIÓN DE BROTES DE *Vaccinium corymbosum*

#### [INORGANIC SALTS AND 2iP IN CULTURE MEDIUM FOR SHOOTS PROLIFERATION OF *Vaccinium corymbosum*]

##### 5.1 Resumen

La micropropagación es técnica eficiente para la propagación masiva de arándanos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la proliferación de brotes de *Vaccinium corymbosum* durante la etapa de multiplicación de propágulos, en respuesta a sales inorgánicas y la concentración de 2-isopenteniladenina. Segmentos de tallo de 2 cm de longitud que solo tenían yemas axilares y otros segmentos tenían ápice, se establecieron en medios de cultivo con sales inorgánicas Woody Plant Medium 50%, Murashige y Skoog 50% y la combinación MS50%-WPM50%, con diferentes concentraciones de 2iP (0, 2, 4, 6 y 8 mg L<sup>-1</sup>), que contenían 25 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0.4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina-HCL, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 2 mg L<sup>-1</sup> de glicina y 5.7 g L<sup>-1</sup> agar. Se evaluaron longitud de brote, número de hojas y número de brotes a los 40, 80 y 120 días de incubación. El experimento se estableció en un diseño completamente aleatorio. Después de 120 días de incubación, los brotes de segmentos apicales y los brotes originados de yemas axilares alcanzaron longitudes promedio de 3.0 y 2.6 cm, respectivamente. El crecimiento en longitud de brotes (3,9 cm), número de hojas (11,0) y número de brotes (1,0) fue significativamente mayor en el medio MS50%. El mayor crecimiento en longitud de brotes (3,4 cm), número de hojas (10,5) y número de brotes (1,0) se observó en los medios de cultivo suplementados con 4, 6 y 8 mg L<sup>-1</sup> 2iP.

**Palabras clave:** reguladores de crecimiento, micropropagación, segmento de tallo, WPM

## 5.2 Abstract

*In vitro* culture has proven to be an efficient technique for mass propagation of blueberries. The objective of this work was to evaluate the proliferation of *Vaccinium corymbosum* shoots during the propagule multiplication stage through the effect of inorganic salts and 2-isopentenyl adenine concentration. Stem segments 2 cm long that had only axillary buds and other segments had apex were established on culture media with inorganic salts Woody Plant Medium 50%, Murashige and Skoog 50% and the combination MS50%-WPM50%, with different concentrations of 2iP (0, 2, 4, 4, 6 and 8 mg L<sup>-1</sup>), containing 25 g L<sup>-1</sup> sucrose, 100 mg L<sup>-1</sup> myo-inositol, 0.4 mg L<sup>-1</sup> thiamine-HCL, 0.5 mg L<sup>-1</sup> pyridoxine, 0.5 mg L<sup>-1</sup> nicotinic acid, 2 mg L<sup>-1</sup> glycine, and 5.7 g L<sup>-1</sup> agar. Shoot length, number of leaves, and number of shoots were evaluated at 40, 80 and 120 days of incubation. The experiment was established in a completely randomized design, with a 2×3×5 factorial arrangement. After 120 days of incubation, apical segment shoots and shoots originating from axillary buds reached average lengths of 3.0 and 2.6 cm, respectively. Growth in shoot length (3.9 cm), number of leaves (11.0) and number of shoots (1.0) was significantly higher on MS50% medium. The highest growth in shoot length (3.4 cm), number of leaves (10.5), and number of shoots (1.0) was significantly observed in the media supplemented with 4, 6 and 8 mg L<sup>-1</sup> 2iP.

**Keywords:** growth regulators, micropropagation, shoot growth.

## 5.3 Introducción

El arándano, *Vaccinium corymbosum* es un arbusto perenne de hoja caduca, que pertenece a la familia Ericaceae. Las bayas de arándano contienen compuestos fitoquímicos (antocianinas, flavonoides y ácido clorogénico) que tienen efectos benéficos para la salud, ya que previenen enfermedades crónicas como: neurodegenerativas, trastornos cardiovasculares, cáncer y diabetes (Maya-Cano *et al*, 2021; Hunková *et al.*, 2020; Schuchovski y Biasi, 2019; Wang *et al*, 2019; Chen *et al.*, 2018). Esto ha generado interés por su consumo, alta demanda a nivel mundial, y ha propiciado el establecimiento de huertos comerciales en México, y demanda de plantas que posean calidad genética, morfológica, fisiológica y fitosanitaria. Esta especie se propaga asexualmente mediante

cultivo de tejidos vegetales, ya que permite producir gran número de plántulas genéticamente uniformes y libre de patógenos (Georgieva y Kondakova, 2021; Mohammad *et al.*, 2014; Tsamura, 2008; Retamales y Hancock, 2012). La morfogénesis de las plantas *in vitro* puede lograrse por dos vías: la embriogénesis somática, y la organogénesis que puede ser *de novo*, adventicia o brotación axilar (Zhang y Lemaux, 2012; Remage, 2002), en la organogénesis se generan nuevos órganos de manera independiente. Los reguladores de crecimiento de tipo citocininas, son esenciales en los medios de cultivo *in vitro*, porque promueven en el explante la división de células somáticas diferenciadas y la formación de centros meristemáticos que darían origen a nuevos brotes; este proceso involucra tres aspectos: respuesta de las células somáticas ante el estímulo hormonal, inicio de divisiones celulares, la organización de centros meristemáticos y el desarrollo de órganos. En otros casos las citocininas estimulan la brotación de yemas axilares (Zhang y Lemaux, 2012).

Existen reportes de investigaciones en las que han evaluado diferentes medios de cultivo y citocininas, en la micropropagación de para arándano, tales como Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd y McCown, 1981), MS (Murashige y Skoog, 1962), Anderson (AN) (Anderson, 1980). El 2-isopentenil adenina (2iP), zeatina (ZT), así como la citocinina sintética tidiazurón (TDZ) son utilizadas en medios de cultivo para la proliferación de brotes de *Vaccinium* sp (Clapa *et al.*, 2022; Schuchovski *et al.*, 2020; Borsai *et al.*, 2019). La incorporación de reguladores de crecimiento al medio de cultivo determina la respuesta morfogénica (Zhou *et al.*, 2023; Hunková *et al.*, 2020; Schuchovski y Biasi, 2019), además son las encargadas de interrumpir la dominancia apical y liberar las yemas laterales de letargo (George y Klerk, 2008). Por lo anterior, en el presente estudio se evaluó el tipo de segmento de tallo, apical o con solo yemas axilares, que se establecieron

en medios de cultivo que variaron en la concentración del 2iP, y sales inorgánicas, en su efecto en la proliferación de brotes de *Vaccinium corymbosum*, var. Biloxi, durante la etapa de multiplicación de propágulos.

## 5.4 Materiales y métodos

### 5.4.1 Material vegetal

El presente estudio se realizó durante 2022 en un el Laboratorio de cultivos de tejidos vegetales, del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, ubicado en Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. Plantas micropropagadas de arándano *Vaccinium corymbosum*, var. biloxi fueron adquiridas a la empresa BIOTEC MARPA SPR DE RL DE CV®, en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán. Estas plantas se establecieron en bolsas de polietileno negro de 30.8 dm<sup>3</sup>, en un sustrato que fue una mezcla de turba 35%, fibra de coco 35% y perlita 30%; y se mantuvieron en vivero bajo sombra con malla al 35 %, en donde se les proporcionaron riegos con regadera manual y fertirriego una vez por semana con solución universal Steiner (1984).

### 5.4.2 Etapa I: Establecimiento de cultivos asépticos

Para el establecimiento de cultivos asépticos *in vitro* se preparó medio de cultivo con una mezcla de sales minerales Murashige y Skoog, MS (Murashige y Skoog, 1962) a 50% y las sales minerales Woody Plant Medium, WPM (Lloyd y McCown, 1981) a 50%, complementado con 25 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 1.5 mg L<sup>-1</sup> de 2iP, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol, piridoxina 0.5 mg L<sup>-1</sup>, ácido nicotínico 0.5 mg L<sup>-1</sup>, glicina 2 mg L<sup>-1</sup>. El pH del medio se ajustó a 5, con HCl o NaOH 1 N, antes de agregar 5.7 g L<sup>-1</sup> de agar. El agar se disolvió

mediante calor y agitación en parrilla y se distribuyeron 20 mL en cada frasco de vidrio de 145 cm<sup>3</sup>, y se colocó una tapa de polipropileno, para esterilizar los frascos con medio de cultivo en autoclave a 1.2 kg cm<sup>-2</sup> de presión a 120 °C durante 17 min.

De las plantas que tenían cinco meses en vivero, se seleccionaron ramas nuevas y sanas, de las que se cortaron varetas de 5 a 10 cm de longitud, de consistencia herbácea, con ápice y yemas axilares, de apariencia sanas y óptimas condiciones físicas; éstas se colocaron en bolsas de polietileno para su transporte al laboratorio en donde se cortaron en segmentos de 5 cm de longitud, y colocaron en un vaso de precipitado de vidrio de 200 mL. Se sometieron a desinfección superficial que consistió en lavado en agua con 0.5% p/v detergente y se enjuagaron con agua potable; posteriormente se sumergieron durante 15 min en una solución al 0.3% de hipoclorito de sodio, seguido de tres enjuagues con agua esterilizada, este último paso se realizó en la campana de aire filtrado de flujo laminar horizontal. Los segmentos de tallo con yemas axilares se colocaron en cajas Petri de 10×100 mm, de vidrio, esterilizadas, y se cortaron segmentos de 2.5 a 3 cm, que tuvieran una o dos yemas axilares, para establecer dos segmentos en cada frasco de cultivo de 145 cm<sup>3</sup> que contenían 20 mL de medio de cultivo esterilizado y consistencia de gel. Los cultivos *in vitro* se incubaron por 60 días en un intervalo de temperatura de 15-28 °C, bajo iluminación LED, en fotoperiodos de 16 h luz y 8 h oscuridad. Finalmente, solo se seleccionaron los cultivos asépticos.

#### 5.4.3 Etapa II: Fase experimental

Se prepararon 300 mL de una “solución básica” que contenía: 25 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0.4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina-HCL, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 2 mg L<sup>-1</sup> de glicina. Esta solución básica se dividió en tres volúmenes de

100 mL. Al primer volumen se le agregó sales inorgánicas WPM 50%, a un segundo volumen se le integró las sales inorgánicas MS 50%, y a un tercer volumen se le incorporó la combinación de las sales inorgánicas MS50%-WPM 50%. Posteriormente, cada uno de los tres volúmenes se aforó a 500 mL para entonces dividirlo en cinco volúmenes de 100 mL, a cada uno se le agregaron cantidades diferentes de 2iP (0, 2, 4, 6 y 8 mg L<sup>-1</sup>). De esta forma se obtuvieron los 15 medios de cultivo a los que se ajustó el pH a 5.0 antes de agregar 5.7 g L<sup>-1</sup> de agar que se disolvió con calor y agitación, para distribuir 20 mL en cada frasco de vidrio de 145 cm<sup>3</sup>. Se colocaron las tapas de polipropileno y se esterilizaron en autoclave durante 17 min a 120 °C y 1.2 kg cm<sup>-2</sup> de presión. Se tuvieron 8 frascos con cada variante de medio de cultivo.

Los cultivos asépticos *in vitro* de brotes desarrollados a partir de yemas axilares se utilizaron para establecer el experimento. Los brotes se extrajeron de los cultivos asépticos, se colocaron en cajas Petri de vidrio esterilizadas y se cortaron en segmentos de 2.0 cm, para establecer dos segmentos de tallo, un segmento con solo yemas axilares y el otro segmento con el ápice y yemas axilares en cada frasco con alguna de las quince variantes de medio de cultivo para promover el desarrollo de brotes. Los segmentos de tallo en posición vertical y con el tercio inferior insertado en el medio de cultivo gelificado. Después de establecer los segmentos de tallo en el medio de cultivo, se colocó nuevamente la tapa y se selló con polietileno adherente, para entonces incubarlos durante 90 días, en condiciones de 15-28 °C, e iluminación LED 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, en fotoperiodos de 16 h luz y 8 h de oscuridad. La unidad experimental fue un segmento de tallo.

#### 5.4.4 Diseño experimental y Variables a evaluar

El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial  $2 \times 3 \times 5$ , esto es, dos niveles del factor tipo de segmento de tallo: con solo yemas axilares o segmento con ápice y yemas axilares; tres niveles del factor sales inorgánicas: Woody Plant Medium 50%, Murashige y Skoog 50% y la combinación MS50%-WPM50%, y cinco concentraciones de 2iP: 0, 2, 4, 6 y 8 mg L<sup>-1</sup>. Se generaron 30 tratamientos con ocho repeticiones. La unidad experimental fue un frasco con dos segmentos de tallo.

Cuando transcurrieron cuarenta días del establecimiento del experimento, se realizó la primera medición, y posteriormente a los 80 y 120 días, en el periodo noviembre 2022 a enero 2023, en que se cuantificó: longitud de brote (cm), obtenida con una regla; número de hojas, número de brotes. A los datos de las variables se les verificó los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los errores mediante las pruebas Shapiro Wilks y Bartlett ( $\alpha=0.05$ ), respectivamente. Las variables que no cumplieron estos supuestos se transformaron a  $(x+1)^{0.5}$ . Los datos de variables morfológicas y de crecimiento se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias Duncan ( $p \leq 0.05$ ). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa computacional Statistical Analysis System® (SAS Institute Inc., 2014).

## 5.5 Resultados y discusión

### 5.5.1 Análisis de varianza

Los análisis de varianza (Cuadro 6) mostraron que los niveles del factor tipo de segmento de tallo (ST) tuvieron efectos diferentes altamente significativos ( $p \leq 0.01$ ) en el número de brotes a los 120 días de incubación. El factor medio de cultivo (MC), en las variables longitud de brote y número de hojas mostró también efectos altamente significativos ( $p \leq 0.01$ ) a los 40, 80 y 120 días. Las concentraciones de 2-isopentenil adenina (2iP) tuvieron efectos diferentes altamente significativos ( $p \leq 0.01$ ) en las variables longitud de brote a los 40 y 80 días, y efectos significativos ( $p > 0.05$ ) a los 120 días; efectos diferentes altamente significativos ( $p \leq 0.01$ ) en el número de hojas a los 40, 80 y 120 días de incubación, así como en el número de brotes a los 40 y 80 días y efectos significativos ( $p > 0.05$ ) a los 120 días. La interacción MC-2iP tuvo efectos significativos ( $p > 0.05$ ) en las variables longitud de brote y número de hoja a los 40, 80 y 120 días.

Cuadro 6. Resumen del análisis de varianza de diversas variables de *Vaccinium corymbosum*, cultivados *in vitro* en medios de cultivo, en concentraciones de citocininas y sales minerales.

Variables	GL error	Cuadrados medios								
		ST	MC	2iP	STxMC	STx2iP	MCx2iP	STxMCx2iP	error	
LB40	29	2.7**	6.8**	1.1**	0.4*	0.07 <sup>ns</sup>	0.2*	1.1 <sup>ns</sup>	0.13	
LB80	29	0.7*	8.0**	1.3**	0.2 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	0.2*	0.1 <sup>ns</sup>	0.13	
LB120	29	0.4 <sup>ns</sup>	8.9**	0.6*	0.06 <sup>ns</sup>	0.3*	0.3*	0.1 <sup>ns</sup>	0.12	
NH40	29	1.0 <sup>ns</sup>	14.4**	7.4**	0.1 <sup>ns</sup>	0.4 <sup>ns</sup>	1.6*	0.3 <sup>ns</sup>	0.50	
NH80	29	0.01 <sup>ns</sup>	22.7**	8.1**	0.9 <sup>ns</sup>	0.5 <sup>ns</sup>	1.4*	0.2 <sup>ns</sup>	0.48	
NH120	29	0.05 <sup>ns</sup>	23.5**	6.0**	0.7 <sup>ns</sup>	0.7 <sup>ns</sup>	1.5*	0.5 <sup>ns</sup>	0.48	
NB40	29	52.3**	0.2 <sup>ns</sup>	0.9**	0.1 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	0.10	
NB80	29	44.4**	0.6*	1.0**	0.1 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	0.06 <sup>ns</sup>	0.10	
NB120	29	34.6**	0.4*	0.5*	0.06 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	0.10	

GL= grados de libertad; ST= segmento de tallo; MC= medios de cultivo; 2iP= regulador de crecimiento 2 isopentenil adenina; LB= longitud de brote transformada a los 40, 80 y 120 días; NH= número de hojas transformada a los 40, 80 y 120 días; NB= número de brote transformado a los 40, 80 y 120 días. ns= no significativo; \*= significativo ( $P \leq 0.05$ ); \*\*= altamente significativo ( $P \leq 0.01$ ).



Al organizar los datos en función de los niveles de factores principales, los segmentos apicales continuaron desarrollando el tallo principal a los 40, 80 y 120 días, y aumentaron en promedio 2.4, 2.9 y 3.1 cm de altura, respectivamente, magnitudes que en cada caso fueron significativamente diferentes (Duncan 0.05) a los 1.8, 2.5 y 2.7 cm que crecieron los brotes que desarrollaron a partir de yemas axilares. A los 40, 80 y 120 días de incubación, los segmentos de tallo con solo yemas axilares desarrollaron en promedio 1.2, 1.3 y 1.4 brotes axilares, cantidades significativamente (Duncan, 0.05) superiores a 0.1, 0.1 y 0.2 nuevos brotes axilares desarrollados a partir de segmentos que tenían el ápice. En consecuencia, en la etapa de multiplicación de propágulos se sugiere utilizar segmentos de tallo con solo yemas axilares, ya que se incrementa significativamente el potencial de multiplicación en comparación de los segmentos que llevan el ápice.

Los propágulos que se establecieron en medios de cultivo MS50% desarrollaron brotes con 2.9, 3.7 y 4.2 cm de altura a los 40, 80 y 120 días, respectivamente. Brotes que estuvieron en medios de cultivo con sales inorgánicas WPM50% crecieron 1.3, 1.5 y 1.5 cm de altura en el transcurso de 40, 80 y 120 días. Así mismo las variables número de hojas (10.2, 14.1 y 15.5) y número de brotes (0.7, 0.9 y 0.8) fueron significativamente superiores cuando se establecieron en medios de cultivo con las sales inorgánicas MS50% a diferencia de medios que contenían sales inorgánicas WPM50%.

Los propágulos que se establecieron en medios de cultivo con 4 mg L<sup>-1</sup> de Zip, desarrollaron brotes de 2.2, 3.0 y 3.4 cm de altura, a los 40, 80 y 120 días de incubación, respectivamente. En medios de cultivo que contenían 6 mg L<sup>-1</sup> de Zip, los brotes desarrollaron 10.4, 14.2, 15.6 hojas, 0.8, 1.1 y 1.0 brotes a los 40, 80 y 120 días de incubación, respectivamente. (Cuadro 7).

Cuadro 7. Características de propágulos de *Vaccinium corymbosum* cultivados *in vitro* en función de niveles de factores principales.

FAC	ST		MC			2iP (mg L <sup>-1</sup> )					
	VAR	Axilar	Apical	WPM	MS	MS-WPM	0	2	4	6	8
LB40	1.8±0.09 <sup>b</sup>	2.4± 0.1 <sup>a</sup>	1.3±0.8 <sup>c</sup>	2.9±0.1 <sup>a</sup>	2.1±0.1 <sup>b</sup>	1.4±0.1 <sup>b</sup>	2.0±0.1 <sup>a</sup>	2.2±0.1 <sup>a</sup>	2.4±0.1 <sup>a</sup>	2.4±0.1 <sup>a</sup>	2.4±0.1 <sup>a</sup>
LB80	2.5±0.1 <sup>b</sup>	2.9±0.1 <sup>a</sup>	1.5±0.1 <sup>c</sup>	3.7±0.1 <sup>a</sup>	2.8±0.1 <sup>b</sup>	1.8±0.2 <sup>c</sup>	2.5±0.2 <sup>b</sup>	3.0±0.2 <sup>a</sup>	2.9±0.2 <sup>ab</sup>	3.1±0.2 <sup>a</sup>	3.1±0.2 <sup>a</sup>
LB120	2.7±0.1 <sup>b</sup>	3.1±0.2 <sup>a</sup>	1.5±0.1 <sup>c</sup>	4.2±0.2 <sup>a</sup>	3.3±0.2 <sup>a</sup>	2.3±0.3 <sup>c</sup>	2.5±0.2 <sup>bc</sup>	3.4±0.3 <sup>a</sup>	3.0±0.2 <sup>ab</sup>	3.4±0.3 <sup>a</sup>	3.4±0.3 <sup>a</sup>
NH40	8.3±0.4 <sup>a</sup>	8.5±0.3 <sup>a</sup>	5.7±0.2 <sup>b</sup>	10.2±0.4 <sup>a</sup>	9.3±0.5 <sup>a</sup>	5.3±0.4 <sup>c</sup>	7.8±0.5 <sup>b</sup>	8.3±0.6 <sup>b</sup>	10.4±0.7 <sup>a</sup>	10.1±0.6 <sup>a</sup>	10.1±0.6 <sup>a</sup>
NH80	11.3±0.7 <sup>a</sup>	10.6±0.5 <sup>a</sup>	6.7±0.3 <sup>c</sup>	14.1±0.7 <sup>a</sup>	12.0±0.7 <sup>b</sup>	6.6±0.4 <sup>d</sup>	9.3±0.7 <sup>c</sup>	11.6±0.8 <sup>b</sup>	14.2±1.1 <sup>a</sup>	12.6±1.0 <sup>ab</sup>	12.6±1.0 <sup>ab</sup>
NH120	13.0±0.9 <sup>a</sup>	12.2±0.6 <sup>a</sup>	7.2±0.3 <sup>b</sup>	15.5±0.9 <sup>a</sup>	15.2±1.1 <sup>a</sup>	7.2±0.5 <sup>c</sup>	10.1±0.8 <sup>b</sup>	14.1±1.3 <sup>a</sup>	15.6±1.4 <sup>a</sup>	14.3±1.3 <sup>a</sup>	14.3±1.3 <sup>a</sup>
NB40	1.2±0.06 <sup>a</sup>	0.1± 0.03 <sup>b</sup>	0.5±0.06 <sup>b</sup>	0.7±0.09 <sup>a</sup>	0.7±0.09 <sup>a</sup>	0.3±0.07 <sup>c</sup>	0.6±0.1 <sup>b</sup>	0.5±0.09 <sup>bc</sup>	0.8±0.1 <sup>a</sup>	0.8±0.1 <sup>a</sup>	0.8±0.1 <sup>a</sup>
NB80	1.3±0.06 <sup>a</sup>	0.1±0.04 <sup>b</sup>	0.5±0.06 <sup>b</sup>	0.9±0.1 <sup>a</sup>	0.8±0.1 <sup>a</sup>	0.4±0.08 <sup>c</sup>	0.6±0.1 <sup>b</sup>	0.7±0.1 <sup>b</sup>	1.1±0.1 <sup>a</sup>	0.8±0.1 <sup>b</sup>	0.8±0.1 <sup>b</sup>
NB120	1.4±0.08 <sup>a</sup>	0.2±0.04 <sup>b</sup>	0.5±0.07 <sup>b</sup>	0.8±0.1 <sup>a</sup>	0.8±0.1 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>c</sup>	0.6±0.1 <sup>bc</sup>	0.7±0.1 <sup>b</sup>	1.0±0.1 <sup>a</sup>	1.0±0.1 <sup>a</sup>	1.0±0.1 <sup>a</sup>

ST= segmento de tallo; MC= medio de cultivo; WPM= Woody Plant Medium (Lloyd y McCown, 1981); MS= Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962); MS-WPM= combinación de sales inorgánicas MS50% y WPM50%. 2iP= regulador de crecimiento 2 isopentenil adenina; LB= longitud de brote a los 40, 80 y 120 días; NH= número de hoja a los 40, 80 y 120 días; NB= número de brote a los 40, 80 y 120 días. Medias con la misma letra en las filas y los niveles del factor no son significativamente diferentes (Duncan,  $P \leq 0.05$ ); media  $\pm$  error estándar.

El medio de cultivo MS y la combinación de MS-WPM, determinaron el crecimiento de longitud de brote, número de hojas y número de brotes, Tetsumura *et al.*, 2008, en su investigación menciona resultados similares con genotipos de arándano diferentes, sus explantes a los 60 días incubación alcanzaron 2.5 cm de longitud de brote (Earliblue) y en O'Neal 8.5 brotes en la combinación de medios de cultivo (MS-WPM) suplementado con 1mg L<sup>-1</sup> zeatina; las diferencias en las investigaciones se atribuyen a el tipo y la concentración de las sales inorgánicas, regulador de crecimiento y segmento de tallo.

## 5.6 Conclusiones

El tipo de sales inorgánicas y la concentración del regulador de crecimiento fue una condición importante para el crecimiento *in vitro* de propágulos de *Vaccinium corymbosum*. Medios de cultivo con sales inorgánicas MS50% proporcionó mejores condiciones para el crecimiento de los brotes en altura, su número de hojas, y número de brote. Los brotes que crecieron en medios de cultivo suplementados con 4 mg L<sup>-1</sup> de 2-isopentenil adenina (2iP) desarrollaron mayor longitud (3.4 cm), y los brotes en medios de cultivo que contenían 6 mg L<sup>-1</sup> de 2iP desarrollaron 15.6 hojas y 1.0 brotes.

## 5.7 Referencias bibliográficas

- Anderson, W.C. 1980. Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. *Acta Hort.* 112, 13–20.
- Bhojwani, S. S., P. K. Dantu. 2013. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer. New Delhi, India. 309 p. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
- Bonga, J. M., D. J. Durzan. 1987. *Cell and Tissue Culture in Forestry. Volumen 1: General Principles and Biotechnology*. Springer-Science +Business Media. Dordrecht. 422 p. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-0994-1>
- Chen, H. Y., Liu, J., Pan, C., Yu, J. W., & Wang, Q. C. (2018). In vitro regeneration of adventitious buds from leaf explants and their subsequent cryopreservation in highbush blueberry. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 134(2), 193–204. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1412-y>
- Clapa, D., Nemes, S. A., Ranga, F., Harsa, M., Vodnar, D. C., Calinoiu, L. F. 2022. Micropropagation of *Vaccinium corymbosum* L.: An Alternative procedure for the production of Secondary Metabolites. *Horticulturae*, 8 (6), 480. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8060480>
- Gamborg O, Murashige T, Thorpe T y Vasil I. 1976. Plant tissue culture media. *In Vitro* 12(7):473-478.

- George, E. F.; G. J. D. Klerk. 2008. Chapter 3: The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro-and Micro-Nutrients. *In* George, E. F., M. A. Hall and G.J. De Klerk (Eds). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht. pp. 65–113 [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_3)
- Georgieva, M., Kondakova, V., Georgiev D., Hristova, D and Pavlov, A. 2023. Micropropagation of bog blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.) distributed in Bulgaria. *Food Science and Applied Biotechnology*, 6(1), 127-133 DOI: <https://doi.org/10.30721/fsab2023.v6.i1.222>
- Hunková, J., Gajdošová, A and Szabóová, M. 2020. Effect of Mesos Components (MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) on In Vitro Shoot Growth of Blackberry, Blueberry, and Saskatoon. *Plants*, 9, 935; doi:10.3390/plants9080935
- Lloyd, G., McCown, B., 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30, 421–427.
- Maya-Cano, D. A., Arango-Varela, S., Santa-Gonzalez, G. A. 2021. Phenolic compounds of blueberries (*Vaccinium* spp) as a protective strategy against skin cell damage induced by ROS: A review of antioxidant potential and antiproliferative capacity. *Heliyon* 7 (2021) e06297 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06297>
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473–479. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Pizzolato, T. D., Polashock, J. J., Thomas, K. L y Kitto, J. 2014. Anatomía del desarrollo de la regeneración de brotes de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. 'Aurora'). *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 50, 722–728. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9645-x>
- Ramage, C. M., Williams, R. R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 38, 116–124. <https://doi.org/10.1079/IVP2001269>
- Ratnaparkhe, M. B. 2007. Blueberry. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. C. Kole (Ed.). Springer, Berlín, Heidelberg. Vol. 4. pp: 217-227. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-34533-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-34533-6_10)
- Retamales, J. B. & J. F. Hancock. 2012. *Blueberries*. 2 ed. Ed. CABI, Boston, MA., USA. 393 p. (Consultado: 29/05/2023). Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=eVloDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=Retamales,+J.B.,+Hancock,+J.F.,+2018.+Blueberries,+2+ed.+CABI,+Boston,+MA.&ots=ar5OnezzaZ&sig=6J2o91bMUJ0niZvX7HHwR2AbdKE#v=onepage&q=Retamales%2C%20J.B.%2C%20Hancock%2C%20J.F.%2>

C%202018.%20Blueberries%2C%202%20ed.%20CABI%2C%20Boston%2C%20MA.&f=false

- SAS Institute Inc. 2014. Programming with Base SAS ® 9.4, Second Edition. SAS Institute. Cary, NC. USA. 900 p.
- Schuchovski C., Sant'Anna-Santos, B. F., Marra R. C y Biasi L. A. 2020. Morphological and anatomical insights into de novo shoot organogenesis of in vitro 'Delite' rabbiteye blueberries. *Heliyon*, 6 (2020) e05468 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05468>
- Schuchovski, C. S. and Biasi, L. A. 2019. In Vitro Establishment of 'Delite' Rabbiteye Blueberry Microshoots. *Horticulturae*, 5 (1), 24; <https://doi.org/10.3390/horticulturae5010024>
- Tetsumura T, Matsumoto Y, Sato M, Honsho C, Yamashita K, Komatsu H, Sugimoto Y, Kunitake H. 2008. Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae* 119: 72-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.06.028>
- Wang, Y., Dong, X., Huang, H.-Y., & Wang, Y.-Z. (2019). Establishment of efficient adventitious shoots induction system and *ex vitro* rooting in *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae). *Botanical Sciences*, 97(2), 180-191. <https://doi.org/10.17129/botsci.2135>
- Wolfe, D.E., Eck, P., Chin, C.-K., 1983. Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry. *HortScience* 18, 703–705. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.18.5.703>
- Yadong, L., Huayu, M., Zhidong, Z and Wulin. 2006. Effect of Cytokinins on In Vitro Leaf Regeneration of Blueberry. Institute, Department of Horticulture, 715.62 DOI <https://doi.org/10.17660/ActaHortic>.
- Zhang, S and Lemaux P. G. 2004. Molecular Analysis of *In Vitro* Shoot Organogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(4):325–335 <https://doi.org/10.1080/07352680490484569>
- Zhou, Y., Li, Q., Wang, Z and Zhang, Y. 2023. High Efficiency Regeneration System from Blueberry Leaves and Stems. *Life*, 13, 242. <https://doi.org/10.3390/life13010242>

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

Se logró la propagación *in vitro* de arándano *Vaccinium corymbosum* var. Biloxi en las etapas de establecimiento de cultivos asépticos y multiplicación de propágulos, a partir de segmentos de tallo que se obtuvieron de plantas madre en condiciones de vivero. En la regeneración *in vitro* de arándano *Vaccinium corymbosum* L. vía desarrollo de brotes axilares está determinada por la composición del medio de cultivo y el nivel de pH. Las plantas con el mejor crecimiento fueron las que se establecieron en medios de cultivo con sales inorgánicas MS50%-WPM50% con niveles de pH 4.5 o 5.0.

La adición de 2 mg L<sup>-1</sup> de 2iP, promovió la regeneración de brotes en 80% de los explantes, estos brotes fueron más largos, presentaron mayor número de hojas expandidas y mostraron mejor color y vigor que los brotes obtenidos con 8 mg L<sup>-1</sup> de 2iP.

### **Recomendaciones generales**

1. Realizar la selección de las plantas madre, con las características deseables.
2. Evaluar la concentración de medio de cultivo WPM al 100%, y comparar con la combinación MS-WPM.
3. Comparar y evaluar las citocininas zeatina y 2iP.
4. Cubrir las siguientes etapas: enraizado y aclimatación en vivero.

## CAPITULO VII

### LITERATURA CITADA

- Arab, M. M., Yadollahi, A., Shojaeiyan, A., Shokri, S., Ghoghah, S. M. (2014). Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on *in vitro* multiplication of G · N15 (hybrid of almond · peach) vegetative rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12, 81-87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ige.2014.10.001>
- Bhojwani, S. S., P. K. Dantu. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer. New Delhi, India. 309 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
- Bonga, J. M., D. J. Durzan. (1987). *Cell and Tissue Culture in Forestry. Volumen 1: General Principles and Biotechnology*. Springer-Science +Business Media. Dordrecht. 422 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-94-017-0994-1>
- Cabral-Miramontes, J. P., J. A. Chávez-Simental, C. Pulido-Díaz, M. González-Portillo, J. R. Goche-Télles & V. M. Barragán-Hernández. (2022). Propagación *in vitro* de manzano a partir de embriones cigóticos maduros. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 13(4), 603–616. DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i4.2164>
- Carmona O. (2017). *Microtuberización en la especie Dioscorea rotundata cultivar botón*. Tesis M. Sc. Biotecnología, Universidad de Córdoba, 70p.
- Chavez-Cruz, I. L., J. R. Enríquez-del Valle, E. Hernández-Santiago & G. Rodríguez-Ortiz. (2022). Sales minerales y reguladores de crecimiento en medios de cultivo para desarrollo de *Myrmecophila grandiflora*. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 9(S1), 108–116. (Consultado: 29/05/2023). Disponible en: <https://rmae.voaxaca.tecnm.mx/volumen-9-s-2/>



- Chen, H. Y., Liu, J., Pan, C., Yu, J. W., & Wang, Q. C. (2018). *In vitro* regeneration of adventitious buds from leaf explants and their subsequent cryopreservation in highbush blueberry. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 134(2), 193–204. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1412-y>
- Darnell, R.L. (2000). Blueberries. Temperate Fruit Crops in warm climates. Springer, Dordrecht. 430 p. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-94-017-3215-4\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-017-3215-4_16)
- Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., Ruiz Luna, J., Pacheco-Ramírez, A. J., & Vásquez-Vásquez, L. (2018). Crecimiento y condición nutrimental de plantas micropropagadas de *Agave angustifolia* abonadas y fertirrigadas en vivero. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 5(2), 106–115. (Consultado: 29/05/2023). Disponible en: [https://rmae.voaxaca.tecnm.mx/wp-content/uploads/2020/11/4-2018\\_RMAE-28-Agave-to-edit.pdf](https://rmae.voaxaca.tecnm.mx/wp-content/uploads/2020/11/4-2018_RMAE-28-Agave-to-edit.pdf)
- García-González, R., J. R. Enríquez-del Valle, G. Rodríguez-Ortiz, G. V. Campos-Ángeles, E. A. Pérez-García & J. Ruiz-Luna. (2020). Mineral salts and growth regulators for micropropagation of *Laelia halbingeriana* Salazar & Soto Arenas. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 47(2), 105–116. DOI: <https://doi.org/10.7764/ijanr.v47i2.2086>
- George, E. F.; G. J. D. Klerk. (2008). Chapter 3: The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro-and Micro-Nutrients. In George, E. F., M. A. Hall and G.J. De Klerk (Eds). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht. pp. 65–113 DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_3)
- Georgieva, M. & Kondakova, V. (2021). *In vitro* propagation of *Vaccinium corymbosum* L. *Bulgarian Journal of Agricultural Science.*, 27 (2), 323–327. (Consultado: 25/05/2023). Disponible en: Available at: DOI: <https://www.agrojournal.org/27/02-11.pdf>
- Greenway, M. B., Phillips, I. C., Lloyd, M. N., Hubstenberger, J. F., & Phillips, G. C. (2012). A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 48(4), 403–410. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9452-1>
- Guillén, S., Martínez-Palacios, A., Martínez, H., & Martínez-Ávalos, J. G. (2015). Organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis* (Asparagaceae), una especie amenazada del noreste de México. *Botanical Sciences*, 93(2), 221–230. DOI: <https://doi.org/org/10.17129/botsci.129>
- Hine-Gómez, A., & Abdelnour-Esquivel, A. (2013). *In vitro* establishment of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L). *Tecnología En Marcha*, 26(4), 64–71. DOI: <https://doi.org/org/10.18845/tm.v26i4.1584>

- Hunková, J., Gajdošová, A and Szabóová, M. (2020). Effect of Mesos Components (MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) on In Vitro Shoot Growth of Blackberry, Blueberry, and Saskatoon. *Plants*, 9, 935. DOI:10.3390/plants9080935
- Ibarra-López, A., M. C. Ojeda-Zacarías, E. A. García-Zambrano & A. Gutiérrez-Diez. 2016. Inducción *in vitro* de brotes de dos cultivares de aguacate raza Mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* Schltl. & Cham. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(2), 337–347. DOI: <https://doi.org/org/10.29312/remexca.v7i2.348>
- Lloyd, G., McCown, B., (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30, 421–427.
- López, C. (2017). Micropropagación de tres variedades de cama de flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). Tesis M. Sc. Biotecnología, Universidad de Córdoba, Departamento de Química, Montería.
- López-Escamilla, A. L., M. López-Herrera & C. Loaiza-Alanís. (2016). Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* link Et Otto (Cactaceae). *Polibotánica*, 0(42), 153–166. DOI: <https://doi.org/10.18387/polibotanica.42.8>
- Machakova I, E. Zazimalova and E. F. George. (2008) Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. In: George, E. F., M. A. Hall and G.J. De Klerk (eds) *Plant propagation by tissue culture*. Springer. Dordrecht. pp. 175-204.
- Martínez-Villegas, Y. M., M. Andrade-Rodríguez, M. T. Colinas-León, O. G. Villegas-Torres, A. Castillo-Gutiérrez & I. Alía-Tejacal. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Losty). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 38(4) 369– 374. (Consultado: 29/05/2023). Disponible en: DOI: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v38n4/v38n4a4.pdf>
- Maya-Cano, D.A., Arango-Varela, S., Santa-González, G. A. (2021). Phenolic compounds of blueberries (*Vaccinium* spp) as a protective strategy against skin cell damage induced by ROS: A review of antioxidant potential and antiproliferative capacity. *Heliyon* 7: 2, e06297. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06297>
- Molinos-da Silva, C., A. Villegas-Monter, P. Sánchez-García, G. Alcántar-González, M. N. Rodríguez-Mendoza y Ruiz-Posadas, L. M. (2004). "Efecto del potencial osmótico y contenido de CA en el medio de cultivo sobre la distribución de CA<sub>2</sub><sup>+</sup> Y K<sup>+</sup>, producción de biomasa y necrosis apical de VID R110." *Interciencia*, 29(7), 384-388. (Consultado: 25/05/2023). Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33909407>

- Montiel-Frausto, L. B., J. R. Enríquez-del Valle & A. Cisneros. (2016). Propagación *in vitro* de *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Brittony Rose. *Biocnología Vegetal*, 16(2), 113–123. (Consultado: 29/05/2023). Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/516/pdf>
- Morard, P. and Henry, M. (1998). Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. *Journal of Plant Nutrition* 21:565-1576. <https://doi.org/10.1080/01904169809365504>
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473–479. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Ostrolucká, M. G., Libiaková, G., Ondrušková, E., Gajdošová, A. (2004). *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis Biology* 676: 207-676.
- Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro* culture of higher plants. Springer Science+Business Media Dordrecht. 348 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-94-011-5750-6>
- Polo, J., Suárez, I y Gatti, K. (2013). Micropropagación de *Tectona grandis* L. F. a partir de meristemos pre-existentes. *Temas Agrarios* 18(2):83-93.
- Ramage, C. M. y Williams, R. R. (2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant.* 38, 116-124. DOI: <https://doi.org/10.1079/IVP2001269>
- Ratnaparkhe, M. B. (2007). Blueberry. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. C. Kole (Ed.). Springer, Berlín, Heidelberg. Vol. 4. pp: 217-227. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-540-34533-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-34533-6_10)
- Retamales, J. B. & Hancock, J. F. (2012). Blueberries. 2 ed. Ed. CABI, Boston, MA., USA. 393 p. (Consultado: 29/05/2023). Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=eVloDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=Retamales,+J.B.,+Hancock,+J.F.,+2018.+Blueberries,+2+ed.+CABI,+Boston,+MA.&ots=ar5OnezzaZ&sig=6J2o91bMUJ0niZvX7HHwR2AbdKE#v=onepage&q=Retamales%2C%20J.B.%2C%20Hancock%2C%20J.F.%2C%202018.%20Blueberries%2C%202%20ed.%20CABI%2C%20Boston%2C%20MA.&f=false>
- Rodríguez-Mateos, A., Cifuentes-Gómez, T., Tabatabaee, S., Lecras, C and Spencer, J. P. E. (2011). Procyandin, Anthocyanin, and Chlorogenic Acid Contents of Highbush and Lowbush Blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60 (23): 5772-8. DOI: 10.1021/jf203812w
- Ruzić, D., Sarić, M., Cerović, R & Čulafić, L. (2001). Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry

rootstock Gisela 5 *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 9–14. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1006412901992>

SAS Institute Inc. (2014). Programming with Base SAS ® 9.4, Second Edition. SAS Institute. Cary, NC. USA. 900 p.

Schuchovski, C. S and Biasi, L. A. (2019). *In Vitro* Establishment of 'Delite' Rabbiteye Blueberry Microshoots. *Horticulturae*, 5 (1), 24. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae5010024>

Schuchovski, C., Sant' Anna-Santos, B. F., Marra R. C y Biasi L. A. (2020). Morphological and anatomical insights into de *nov*o shoot organogenesis of *in vitro* 'Delite' rabbiteye blueberries. *Heliyon*, 6 (2020) e05468 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05468>

Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2022. *Panorama agroalimentario 2022*. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. CDMX. (Consultado: 24/05/2023). Disponible en: [https://www.gob.mx/siap/es/archivo/acciones\\_y\\_programas](https://www.gob.mx/siap/es/archivo/acciones_y_programas)

Steiner, A. A. (1984). The universal nutrient solution. *In*: Proc. Sixth International Congress on Soilles Culture. International Soc. Soilles Culture. The Netherlands. pp:633- 647.

Suárez I y Otero R. (2016). Ácido abscísico y sacarosa afectan la producción in vitro de túberos de ñame (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Temas Agrarios* 21(1):9-17.

Suárez I, Ortiz O y López C. (2017). Arrow cane (*Gynerium sagittatum* Aubl.) in vitro rhizome formation and plantlet recovery. *Temas Agrarios* 22(1):9-18.

Suárez I. (2011). Reguladores de Crecimiento Vegetal en el Cultivo de Tejidos In Vitro. *XLI Congreso Anual COMALFI*, Ibagué21-23 septiembre, pp.91-94.

Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K., Komatsu, H., Sugimoto, Y., Kunitake, H. (2008). Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae* 119: 72-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.06.028>

U.S. Department of Agriculture (USDA). 2021. *Blueberries Around the Globe-Past, Present, and Future*. United States Department of Agriculture. (Consultado: 24/05/2023). Disponible en: <https://www.fas.usda.gov/data/blueberries-around-globe-past-present-and-future>

Victoriano, M. H. (2010). Organogenesis *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) Tesis de Maestría en ciencias. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional CIDIR-Michoacán. Instituto Politécnico Nacional, Jiquilpan, Michoacán, 45.

- Wang, Y., Dong, X., Huang, H.-Y., & Wang, Y.-Z. (2019). Establishment of efficient adventitious shoots induction system and *ex vitro* rooting in *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae). *Botanical Sciences*, 97(2), 180-191. <https://doi.org/10.17129/botsci.2135>
- Wolfe, D. E., Eck, P., Chin, C. K., (1983). Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry. *HortScience* 18, 703–705. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.18.5.703>
- Zárate, N. B., Yescas, A. A., & Morales, D. V. J. (2017). Manejó agronómico del cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en la Sierra Norte de Oaxaca. *Universidad & Ciencia*, 6, 138–155. <http://revistas.unica.cu/uciencia>