

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

MEMORIA DE TÍTULO

**MEJORAMIENTO DEL PROCESO DE PROPAGACIÓN IN VITRO DE PLANTAS
DE ARÁNDANO PARA LAS VARIEDADES *BLUECROP, DUKE Y MISTY***

MARISOL ALEJANDRA TORO CANO

Santiago, Chile

2009

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

MEMORIA DE TÍTULO

**MEJORAMIENTO DEL PROCESO DE PROPAGACIÓN IN VITRO DE PLANTAS
DE ARÁNDANO PARA LAS VARIEDADES *BLUECROP, DUKE Y MISTY***

**IN VITRO PROPAGATION PROCESS IMPROVEMENT FOR BLUEBERRY
PLANTS VARIETIES BLUECROP, DUKE AND MISTY**

MARISOL ALEJANDRA TORO CANO

Santiago, Chile

2009

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

MEJORAMIENTO DEL PROCESO DE PROPAGACIÓN IN VITRO DE PLANTAS DE
ARÁNDANO PARA LAS VARIEDADES *BLUECROP*, *DUKE* Y *MISTY*.

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniero Agrónomo

MARISOL ALEJANDRA TORO CANO

Profesor Guía	Calificaciones
Sra. María Loreto Prat D. Ingeniero Agrónomo Mg.	5,8
Profesores Evaluadores	
Sra. Loreto Canáves S. Ingeniero Agrónomo M.S.	4,8
Sr. Herman Silva R. Biólogo, M.Sc. Dr.	6,0
Colaborador	
Sra. Marina Gambardella C. Ingeniero Agrónomo Dr.	

Santiago, Chile

2009

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis padres Iris y Eduardo, a mi abuela y abuelo que a pesar de que ya no está con nosotros físicamente, sigue presente en mi corazón y mis recuerdos, en especial a Ricardo quien me ha brindado su incondicional apoyo y amor en los momentos difíciles en esta etapa final, a toda mi familia y amigas por el gran apoyo, preocupación, cariño y dedicación que me han demostrado durante todo el desarrollo de mi carrera y sobre todo en esta última etapa. A todos ellos dedico esta memoria.

A mis profesoras guías Loreto Prat y Marina Gambardella, les agradezco la paciencia y dedicación que tuvieron hacia mí, en la orientación y colaboración durante el desarrollo de este trabajo.

Al profesor Ricardo Pertuzé, por su gran disposición, paciencia y ayuda en el desarrollo estadístico de esta memoria.

Finalmente agradecer a todos los que estuvieron involucrados directa o indirectamente con el desarrollo de mi memoria.

A mi familia.....

..... Gracias.....

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCIÓN	8
Objetivos	11
MATERIALES Y METÓDO	12
Material Vegetal y Cultivo in vitro	12
Metodología	12
Ensayo de establecimiento in vitro.....	13
Ensayo de multiplicación in vitro.....	16
Ensayo de aclimatación	17
Análisis estadístico	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
Ensayo de establecimiento in vitro.....	19
Ensayo de multiplicación in vitro.....	22
Ensayo de aclimatación.....	25
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	35
ANEXOS	38
Protocolo Micropropagación WPM	38

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de mejorar y adaptar el protocolo de micropropagación normalmente utilizado para arándano, Woody Plant Medium (Lloyd y McCown, 1980) (Anexo 1), utilizado en el Laboratorio de Genética Vegetal de la Universidad de Chile para las variedades highbush: Bluecrop, Duke y Misty.

Se realizaron ensayos con el fin de cubrir todo el proceso de micropropagación, desde la etapa de establecimiento hasta la aclimatación. En la etapa de establecimiento se realizó un ensayo de luz y oscuridad, con el fin de disminuir los explantes necrosados, causados por la presencia de compuestos fenólicos al someter los explantes a altas intensidades lumínicas. Se determinó estadísticamente que no existían diferencias significativas entre los tratamientos, para los parámetros número, crecimiento, tasas de establecimiento y tasa de proliferación de brotes, en las tres variedades, sin embargo se observó una tendencia positiva en respuesta a la oscuridad en las variedades Misty y Duke en los parámetros evaluados, mientras que la variedad Bluecrop se comportó en forma indiferente a la oscuridad.

En la etapa de multiplicación se realizó un ensayo donde se probaron 4 niveles de pH en los medios de cultivo (pH: 5,0 – 5,3 – 5,7 – 6,0) con el objetivo de determinar el nivel al cual se produjo mayor crecimiento de brotes. Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para los parámetros evaluados y variedades, sin embargo también se presentó una tendencia positiva al crecimiento de brotes y tasa de proliferación a pH 5,0-5,3. A pH más altos se mantuvo el crecimiento de los brotes, pero este fue menor, y en algunos casos se produjo necrosamiento de explantes, comportamiento que se repitió en las tres variedades.

Se realizó un ensayo de pre-aclimatación in vitro solo en la variedad Bluecrop para determinar el efecto de enraizamiento y aclimatación de los brotes. Los tratamientos de pre-aclimatación in vitro consistieron en someter los brotes durante 30 o 60 días en un medio de cultivo sin regulador de crecimiento, y una repetición de cada uno de ellos agregando 20 cc de agua destilada estéril sobre el medio sólido, 10 días antes de completar los 30 o 60 días. Se encontraron diferencias significativas en el número de brotes enraizados, a los 10 días de evaluación, presentando mayor número de brotes enraizados en aquellos sometidos a 30 días en un medio sin regulador de crecimiento. Por otra parte los brotes sometidos durante 60 días en este medio sin regulador de crecimiento y su repetición con agua, presentaron mayor longitud, vigor, tamaño y número de hojas. La adición de agua destilada no tuvo un efecto mayor en la aclimatación de los brotes.

Palabras claves

Vaccinium corymbosum L., micropropagación, cultivo in vitro, aclimatación.

ABSTRACT

This research was conducted to improve and adapt the protocol normally used for micropropagation of blueberry Woody Plant Medium (Lloyd and McCown, 1980) (Annex 1) used in the Laboratory of Plant Genetics, University of Chile, for varieties highbush, Bluecrop, Duke and Misty.

Trials were conducted in order to cover all the micropropagation process, from setting up the stage of acclimation. At the stage of establishing a trial of light and darkness, in order to reduce the explants necrotic, caused by the presence of phenolic compounds, subjecting explants to high light intensity. It was determined that there were no statistically significant differences among the treatments for the parameters number, growth rates of establishment and rate of proliferation of shoots in the three varieties, however a positive trend was observed in response to the dark varieties Misty Duke and evaluated on the parameters, while the variety Bluecrop behaved in any way in the dark.

During the multiplication was performed a test where 4 different pH levels were tested: 5,0-5,3- 5,7- 6,0 in the culture media to determine the level at which there was greater growth of shoots. No statistically significant differences were found between treatments for the evaluated parameters and varieties; however it was observed a positive trend in the growth rate of shoots and proliferation at pH 5.0-5.3. Higher pH maintained shoot growth, but this was minor, and in some cases there were necrotic explants, this behaviour were observed in the three varieties.

It was performed a trial of pre-acclimated in vitro only in the variety Bluecrop to determine their effect on rooting and acclimatization of shoots. The pre-treatment consisted of in vitro acclimatization submit outbreaks for 30 or 60 days in culture medium without growth regulators, and a repeat each adding 20 cc of sterile distilled water on the solid medium, 10 days before completing the 30 and 60 days. We found significant differences in the number of rooted shoots, the 10 days of evaluation, a greater number of shoots rooted in those subjected to 30 days in a medium without growth regulators. On the other hand shoots subjected during 60 days in this medium without growth regulator and re-using water, showed a greater length, force, size and number of leaves. The addition of distilled water did not have a greater effect on acclimation of shoots.

Keywords

Vaccinium corymbosum L., micropropagation, in vitro culture, acclimatization.

INTRODUCCIÓN

El arándano es un arbusto perteneciente a la familia Ericaceae y al género *Vaccinium*, originario de Norte América, siendo Estados Unidos el principal productor e importador a nivel mundial. Este cultivo se introdujo en Chile en los años 80 destinado principalmente al abastecimiento en contra estación del mercado de fruta fresca de Estados Unidos. La alta demanda en el mercado norteamericano y la difusión de su consumo en otros mercados del hemisferio norte, unidas a la alta rentabilidad de su cultivo, han motivado una gran expansión de la superficie plantada en nuestro país. Estimaciones preliminares cifran la superficie de arándanos en unas 10.763 ha en la actualidad (Censo Frutícola, 2007), que se distribuyen entre las regiones de Coquimbo y Los Lagos (ODEPA, 2007). Esta gran expansión ha permitido que Chile se convierta en el principal exportador de arándanos en el hemisferio sur (Bañados, 2006; Brazelton y Strik, 2007; Caligari *et al.*, 2009).

Entre las especies cultivadas del género *Vaccinium*, las de mayor importancia son el arándano ojo de conejo (*Vaccinium ashei* R) y el arándano alto o “highbush” (*Vaccinium corymbosum* L.) Este último representa más del 80% del total de las especies cultivadas (ODEPA, 2007). Las variedades seleccionadas para realizar el presente estudio son todas “highbush”.

El gran aumento en la superficie cultivada de arándanos desde sus inicios hasta la fecha, ha producido un gran incremento en la demanda de plantas de buena calidad, traducido en un mejoramiento del sistema de propagación tradicional y el uso de nuevas técnicas de producción de plantas, como es el uso de herramientas biotecnológicas, como la micropropagación.

El arándano se propaga tradicionalmente por enraizamiento de estacas. Sin embargo, esta forma de propagación tiene una serie de complicaciones, traducidas principalmente en un bajo porcentaje de enraizamiento, plantas de gran tamaño, escaso desarrollo radical, menor desarrollo lateral debido a que no forman coronas, y por lo tanto el número de ramillas productivas es limitado. Es por esto que se recurre a la técnica de micropropagación ya que los brotes “in vitro” tienden a una mayor brotación lateral y producen más botones florales por planta, aumentando así el potencial productivo de la especie (Read *et al.*, 1987; El-Sheikh *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 2006). Además, esta técnica permite propagar material libre de enfermedades y asegurar la producción de plantas genéticamente idénticas a la madre (clones).

La micropropagación consiste en generar una planta completa a partir de un pequeño brote o esqueje con una yema axilar, los cuales son cultivados bajo condiciones asépticas en un medio nutritivo específico. El uso de esta técnica permite la propagación rápida de materiales escasos que se deseen incrementar en un corto período de tiempo. En arándanos, la técnica ha sido utilizada con éxito para la propagación clonal (Poirot, 1991).

Para obtener una alta tasa de multiplicación in vitro se deben mantener controlados los factores nutricionales y ambientales, que permitan entregar una producción económicamente viable. Dentro de los factores que se deben optimizar durante el proceso de cultivo in vitro, se pueden mencionar los siguientes: tipo y dosis de reguladores de crecimiento, pH del medio de cultivo, manejo adecuado de la luz. Por otra parte, la ambientación de las plantas una vez que éstas han completado su proceso in vitro, también está influenciada por una serie de factores. Entre ellos se destacan, el desarrollo de los brotes alcanzados en la etapa previa, los sustratos a utilizar, junto con el control de temperatura y humedad.

Wolfe *et al.*, (1983) realizaron un trabajo en el cual probaron 7 medios de cultivo para arándano, llegando a la conclusión que el mejor medio de cultivo fue el “Woody Plant Médium” (WPM) descrito por Lloyd y McCown (1980) (Anexo1).

En la composición de los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento juegan un rol de primer orden, los cuales dependen de la especie vegetal y de la etapa de micropropagación (Castillo, 2004).

Con el objetivo de interrumpir la dominancia apical y así promover la inducción y proliferación de yemas axilares in vitro, se recurre al uso de citocininas, siendo importante determinar las concentraciones más adecuadas y el tipo de citocinina que debe usarse en cada caso. Estos son los factores de mayor influencia en el éxito de la micropropagación in vitro. Específicamente para el cultivo in vitro del género *Vaccinium*, se estableció que las citocininas tenían un importante efecto en la proliferación de brotes (Ostrolucká *et al.*, 2004; Erig y Schuch, 2006).

Trabajos realizados por Ostrolucká *et al.*, (2004) en micropropagación de arándanos, donde se compara el efecto de dos citocininas; 2-isopentil-adenina (2ip) y zeatina, demostraron que la proliferación de brotes in vitro es mayor en medios de cultivo con zeatina en comparación al 2ip. Sin embargo, Chandler y Draper (1986) y Zhidong *et al.*, (2006) determinaron que el uso de zeatina producía una mayor proliferación de brotes pero su costo era mucho más elevado en comparación al uso 2ip, con el cual se obtuvo una buena relación entre la tasa de proliferación de brotes y los costos de producción.

Debnath y McRae (2001) obtuvieron buenos resultados en la proliferación in vitro de *Vaccinium macrocarpon* cuando los explantes se cultivaron en un medio con dosis entre 2,5 – 5,0 mg de 2ipL⁻¹.

Zimmerman y Broome (1980); Poirot (1991); González *et al.*, (2000); Debnath y McRae (2001) probaron diferentes concentraciones de 2ip y evaluaron su efecto en la proliferación de brotes de arándanos. En estos trabajos se determinó que una alta concentración de esta citocinina (mayor de 15-20 mgL⁻¹) produce mayor número de brotes pero de menor longitud. Debnath y McRae (2001) determinaron además que dosis muy altas de 2ip producían un aumento de la producción de callos, brotes con un menor número de hojas y de bajo vigor. Por último, en estudios realizados en Chile se determinó que la concentración óptima de 2ip varía entre 5 y 10 mgL⁻¹, dependiendo de la especie (Muñoz, 1991).

La oxidación fenólica es un grave problema en el cultivo in vitro de las especies leñosas. Se manifiesta por el ennegrecimiento del tejido y puede limitar el enraizamiento, disminuir la viabilidad de los explantes y su respuesta morfogénica, causando la inhibición o muerte de explantes de un amplio rango de especies. El fenómeno de pardeamiento ocurre por acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas. Estas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas, sustancias que a su vez pueden polimerizarse y afectar a las proteínas, y en consecuencia, inhiben el crecimiento y la viabilidad de los explantes (Velásquez *et al.*, 2004; Espinosa *et al.*, 2005).

Al someter los explantes a altas intensidades lumínicas, estos pueden presentar pardeamiento, coloraciones rojizas y azuladas, producto de la presencia de fenoles (Poirot, 1991). Por lo tanto, el manejo de la luz es fundamental en la micropropagación de esta especie.

Para evitar el pardeamiento de los explantes sugieren disminuir la intensidad de la luz, agregar antioxidantes al medio y subcultivar con frecuencia (Swartz y Lindstrom, 1986; Sánchez y Salaverría, 2004).

Para disminuir los problemas causados por los fenoles en el cultivo in vitro, Erig y Schuch (2005) sometieron a oscuridad por 7 días los explantes del cultivar Delite, obteniendo brotes etiolados. Determinaron que este tratamiento logró reducir la oxidación fenólica in vitro al obtener un menor porcentaje de explantes necrosados, en comparación a explantes que se sometieron al fotoperíodo e intensidad lumínica normal.

El pH del medio de cultivo es uno de los factores importantes en la morfogénesis in vitro de células y tejidos vegetales (Kobayashi *et al.*, 1995). Este puede afectar la solubilidad de algunos componentes del medio de cultivo y la absorción de determinados nutrientes por parte del explante.

Las plantas de arándano se desarrollan mejor en suelos ácidos, de pH 4,0 - 5,5 (Sudzuki, 2002).

El género *Vaccinium sp.*, se caracteriza por estar constituido por plantas que requieren de pH ácidos. Ostrolucká *et al.*, (2004) en trabajos de micropropagación, determinaron que el cultivar Duke presenta diferencias en la intensidad de brotación según el pH del medio (pH 4,0 a 5,0), observando que el efecto sobre la multiplicación de brotes era más alto en un pH 5,0 y menor sobre un pH 3,0.

Las plantas in vitro crecen bajo condiciones muy especiales, como la atmósfera de los contenedores (humedad, niveles de CO₂, O₂, C₂H₄ y otros gases), baja intensidad de luz, altos niveles de hormonas, ausencia de microorganismos. Esto produce ciertas características anatómicas y fisiológicas de las plantas micropropagadas que determinan la susceptibilidad durante las etapas iniciales del proceso de aclimatización (Klerk, 2000).

Para obtener una alta tasa de sobrevivencia y explantes enraizados, los microesquejes deben presentar una condición propicia, de pre-endurecimiento, para aumentar la capacidad fotosintética de los explantes (Smanhotto *et al.*, 2006).

Según Ascough y Fennell (2004) el uso de un medio líquido en doble faz, permite un mejor contacto entre los explantes con los nutrientes y el agua, por lo que aumenta su disponibilidad y se facilita su difusión, produciendo además un incremento del vigor y biomasa de los brotes. Este sistema de doble faz (medio líquido sobre sólido) permite la difusión de los residuos tóxicos de los explantes, fundamentalmente los fenoles que abundan durante la iniciación del crecimiento de las raíces. Así, el desarrollo general del explante es más rápido, permitiendo acortar el período de aclimatación (Sosa, 2004).

También se recomienda elevar la concentración de sacarosas en el medio y uso de medio libre de regulador de crecimiento para lograr un crecimiento vigoroso de los explantes. Estos presentan una mayor supervivencia al ser trasplantadas al suelo, debido a una mejor adaptación para soportar el stress hídrico motivado por las condiciones de mayor presión osmótica donde se desarrollan, unido a una mejor constitución morfológica de la vitroplanta (Jiménez, 1995; Sosa, 2004).

Otro de los factores que influyen en la respuesta a la proliferación *in vitro* es el genotipo, lo que hace necesario ajustar los protocolos de laboratorio para cada variedad que se usará en el proceso de micropropagación.

En base a estos antecedentes, en el laboratorio de genética vegetal de la Universidad de Chile, se realizó la presente investigación que tuvo los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Optimizar el protocolo de micropropagación de plantas de arándano para una producción eficiente en las variedades Bluecrop, Duke y Misty.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la luz y la oscuridad en la etapa de establecimiento de tres variedades de arándano en la propagación *in vitro*.
- Determinar el pH del medio de cultivo más adecuado para la obtención de una mayor tasa de proliferación y calidad de plantas, en la etapa de multiplicación *in vitro* de las tres variedades en estudio.
- Determinar el efecto de diferentes tratamientos en la etapa de pre-aclimatación *in vitro*, sobre la respuesta al proceso de ambientación *ex vitro*.

MATERIALES Y MÉTODO

Los distintos ensayos se realizaron entre los meses de junio del 2007 y agosto del 2008, en el laboratorio de Genética Vegetal perteneciente al área de Fitotecnia, Departamento de Producción Agrícola de la Universidad de Chile.

Material Vegetal

En los ensayos se utilizaron las variedades Bluecrop, Duke y Misty, variedades de arándano alto o “highbush”. Las dos primeras variedades con altos requerimiento de frío pero distintas estaciones de maduración: Duke, de estación temprana, Bluecrop de media estación. Por otra parte, Misty es una variedad de bajo requerimiento de frío que se comenzó a cultivar en Chile desde 1989 (APROA-Agrimed, s.a.).

El material inicial se obtuvo de brotes en activo crecimiento, extraídos desde la parte media de plantas madres de invernadero que forman parte de la colección varietal de la Facultad de Ciencias Agronómicas, de la Universidad de Chile.

Cultivo in vitro

Se utilizó un medio de cultivo base para especies semileñosas WPM (Anexo 1) suplementado con 5 mgL^{-1} de 2isopentil-adenina (2ip), 3% de sacarosa y 0,6% de agar. Se ajustó pH a 5,3 con solución de HCL 0,1% N y NaOH 0,3% N. Los medios de cultivo fueron autoclavados a 1 atmósfera de presión y a 121°C durante 20 minutos. El material vegetal se llevó a cámara de crecimiento con temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 hrs de intensidad luminosa, con un promedio de $20 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Metodología

Se realizaron ensayos independientes para cada una de las variedades en estudio en las distintas etapas del proceso de micropropagación, realizando tres ensayos de luz y oscuridad en la etapa establecimiento correspondiente a cada variedad, así también se realizaron tres ensayos de distintos niveles de pH en la etapa de multiplicación y solo un ensayo en la etapa de aclimatación ex vitro con una de las variedades.

Ensayo de establecimiento in vitro

Tratamientos y diseño experimental

Con el fin de evaluar el efecto de la oscuridad en la capacidad de proliferación y crecimiento de brotes se realizó este ensayo en la etapa de establecimiento. Para la realización de este ensayo se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 2 condiciones de luz, definidas en el Cuadro 1. En una primera fase se usaron 20 tubos con esquejes individuales los que constituyeron una repetición cada uno. En una segunda fase los 20 esquejes se repicaron a frascos con medio de multiplicación WPM dejando 5 brotes en cada uno, y estos pasaron a constituir la unidad muestral (Figura 1).

Cuadro 1. Tratamiento de oscuridad y luz en la etapa de establecimiento in vitro

Tratamiento	Descripción	N° tubos con un esqueje
T1	Oscuridad (etiolación 10 días)	20
T2	Luz (testigo, 10 días)	20

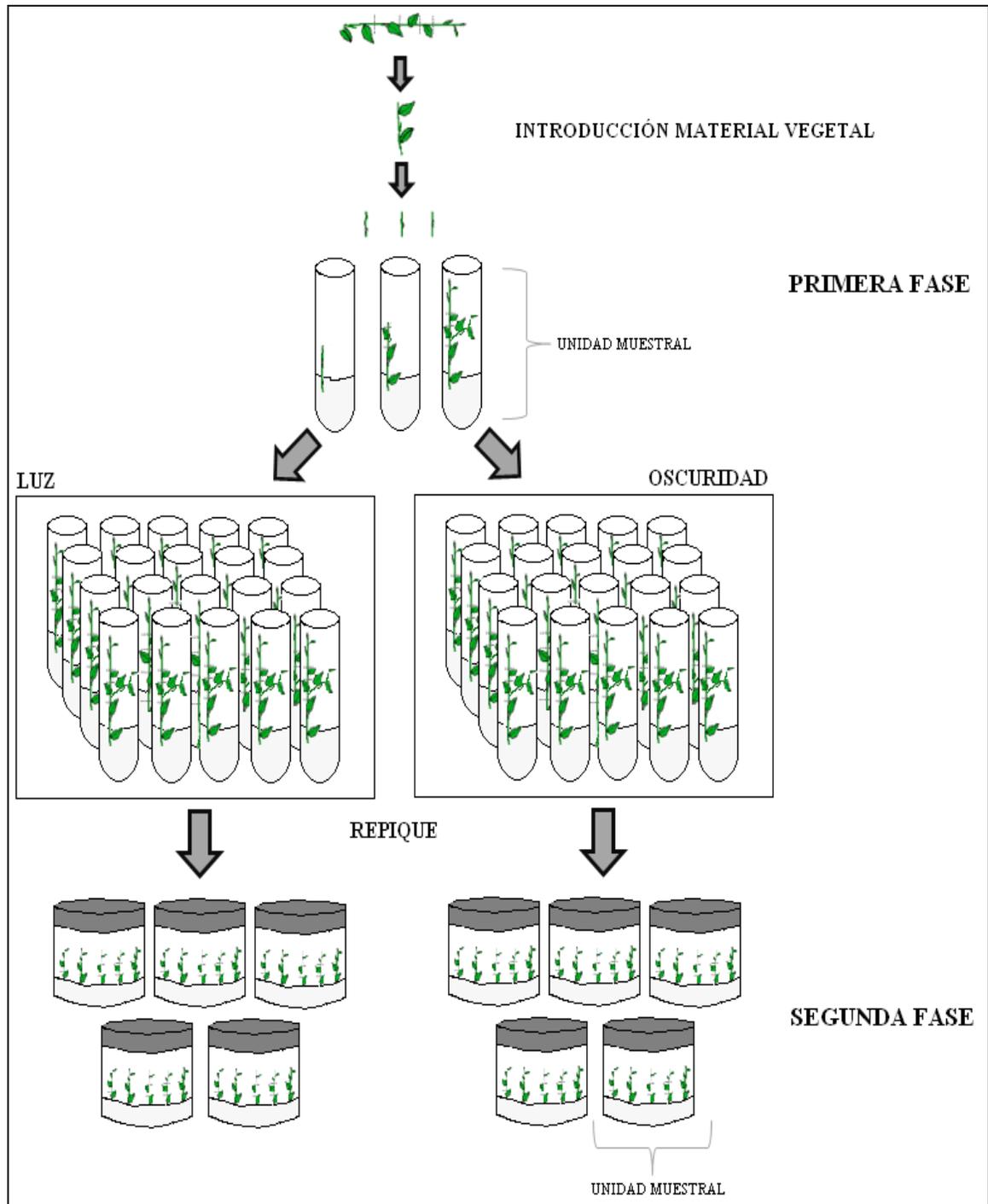


Figura 1. Diagrama de la metodología empleada en el ensayo 1 en la etapa de establecimiento, subdivisión en dos fases de estudio. La unidad muestral en la primera fase corresponde a un tubo con un esqueje cada uno, y en una segunda fase a un frasco con 5 explantes cada uno.

Descripción del ensayo

Para el establecimiento del ensayo se utilizaron esquejes de 5 a 7 cm de longitud, con 1-2 yemas axilares, provenientes de las tres variedades en estudio, previa desinfección con etanol al 70% por 30 segundos, benomilo al 0.1% por 15 minutos y una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 20 minutos. Entre cada tratamiento de desinfección se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Posterior a esto se realizó la siembra de los explantes en tubos de ensayo con 10 ml de medio de cultivo WPM, bajo cámara de flujo laminar.

Una vez iniciada la brotación, se seleccionaron aquellos esquejes que tenían brotes con longitud mayor a 0,5 cm, hasta cumplir un número total de 40 esquejes, los cuales se subdividieron en 20 para el tratamiento de luz y 20 en oscuridad (Figura 1). Este tratamiento de oscuridad se realizó dejando los explantes durante 10 días dentro de una caja cerrada en la cámara de crecimiento. Finalizado los 10 días de tratamiento se realizaron las evaluaciones de número y longitud de brotes. Con este material se realizó un repique a frascos de 250 ml con 40 ml de medio de multiplicación en el cual se mantuvieron durante 30 días. Luego de este período se realizó un segundo repique donde se realizaron las siguientes evaluaciones:

Evaluaciones

- Número y longitud de brotes: medición realizada cada 10 días con una regla graduada en cm durante el periodo de subcultivo (30 días).
- Tasa de Establecimiento:
$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ explantes inicio ensayo}}{\text{N}^{\circ} \text{ explantes finales a los 10 días de ensayo}}$$
- Tasa de Proliferación:
$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ explantes obtenidos a los 30 días de subcultivo}}{\text{N}^{\circ} \text{ explantes iniciales}}$$

Ensayo de multiplicación in vitro

Tratamientos y diseño experimental

Este ensayo tuvo como objetivo ajustar el pH del medio de cultivo en cada una de las variedades evaluadas, durante la etapa de proliferación in vitro. Para ello se realizaron los tratamientos definidos en el Cuadro 2, con un diseño experimental completamente al azar con 4 niveles de pH para cada variedad. Cada uno de los 4 tratamientos tuvo 4 repeticiones de 1 frasco con 5 brotes cada uno, la que constituyó la unidad muestral.

Cuadro 2. Tratamiento de pH en medios de cultivo en la etapa de multiplicación.

Tratamiento	pH del medio de cultivo
T1	5,0
T2 (testigo)	5,3
T3	5,7
T4	6,0

Descripción del ensayo

Para este ensayo se requirieron 80 brotes de 1,5 a 2,0 cm de longitud, de las tres variedades en estudio sometidos a condiciones normales de luz de $20 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, los cuales se repicaron a frascos de 250 ml con 40 ml de medio de multiplicación con distintos pH, según cada tratamiento presentado en el Cuadro 2. Durante esta etapa se realizaron las siguientes evaluaciones:

Evaluaciones

- Número y longitud de brotes: cada 10 días se midieron los brotes utilizando una regla graduada en cm durante el periodo de subcultivo (30 días).
- Tasa de Proliferación:
$$\frac{\text{N}^\circ \text{ explantes finales obtenidos a los 30 días de subcultivo}}{\text{N}^\circ \text{ explantes iniciales}}$$

Ensayo de aclimatación

Tratamientos y diseño experimental

Para evaluar el efecto de diferentes tratamientos in vitro sobre el potencial de enraizamiento y aclimatación, se realizó este tercer ensayo usando brotes de la variedad Bluecrop. Se realizaron 4 tratamientos en una fase de pre-aclimatación in vitro, descritos en el Cuadro 3, para luego ver su efecto en la ambientación ex vitro. Este ensayo contó con un diseño completamente al azar dado por 4 condiciones de pre-aclimatación. Cada uno de los 4 tratamientos tuvo 4 repeticiones y cada una contempló 9 brotes que fueron aclimatados en una bandeja de ambientación después del período de pre-aclimatación, constituyendo la unidad muestral.

Cuadro 3. Tratamientos en la etapa pre-aclimatación in vitro.

Tratamientos	Descripción
T1	30 días en medio de cultivo sin regulador de crecimiento.
T2	30 días en medio de cultivo sin regulador de crecimiento y últimos 10 días se agregó una película de 20 cc de agua destilada estéril al medio de cultivo.
T3	60 días en medio de cultivo sin regulador de crecimiento.
T4	60 días en medio de cultivo sin regulador de crecimiento y últimos 10 días se agregó una película de 20 cc de agua destilada estéril al medio de cultivo.

Descripción del ensayo

Se repicaron brotes crecidos en condiciones de luz a $20 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, utilizando el medio WPM sin regulador de crecimiento, dejando 10 brotes en cada frasco, con 4 frascos por tratamiento (Cuadro 3).

Una vez terminado el tiempo de cada uno de los tratamientos se procedió a la aclimatación de los explantes obtenidos. Para esto se utilizó una solución enraizante de 100 ppm IBA (ácido indol butírico), se sumergió la base del explante en la solución enraizante durante 5 minutos, y se procedió a trasplantar en bandejas de aclimatación (72 alveolos) con sustrato turba y perlita en una relación 1:1. A los diez días de realizar este procedimiento de aclimatación se iniciaron las siguientes evaluaciones:

Evaluaciones

- Vigor de los brotes: se evaluó el vigor en base a un registro fotográfico de los brotes en tratamiento de pre-aclimatación y post tratamientos in vitro, posterior a eso se realizó una nueva evaluación a los 10,20,30 y 60 días de iniciada la aclimatación.
- Presencia o ausencia de raíces: se registro la presencia o ausencia de raíces en cada tratamiento a los 10, 20 y 30 días de iniciada la aclimatación.
- Desarrollo radical: se evaluó el desarrollo radical a los 10, 20,30 y 60 días de iniciada la aclimatación mediante un registro fotográfico.

Análisis Estadístico

Se realizaron análisis de los resultados en forma independiente para cada ensayo y variedad, utilizando un diseño de experimentos completamente al azar.

Para el ensayo en la etapa de establecimiento de los explantes que contó con dos tratamientos, los resultados se analizaron estadísticamente mediante una prueba de T-Student con un 95% de confianza, mientras que para los ensayos de multiplicación y aclimatación, con más de tres tratamientos, los datos obtenidos se sometieron a un Análisis de Varianza (ANDEVA). En el ensayo que presentó diferencias significativas a un 95% de confianza, se realizó una prueba de rango múltiple de Tukey con un 5% de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de establecimiento in vitro

En el Cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos para los parámetros número, crecimiento, tasa de establecimiento y tasa proliferación de brotes, en las dos fases evaluadas. Analizando el efecto de los tratamientos de luz y oscuridad en el desarrollo, crecimiento y oxidación fenólica de los explantes en la etapa de establecimiento de las tres variedades Bluecrop, Misty y Duke, se puede observar que no existieron diferencias significativas en los parámetros evaluados.

Cuadro 4. Número, crecimiento de brotes, tasas de establecimiento y proliferación para cada una de las variedades en los tratamientos de luz y oscuridad.

Fase 1 (10 días)						
Variedad	Nº brotes		Crecimiento de brotes en cm		Tasa de establecimiento	
	Promedio ± ES		Promedio ± ES		Promedio ± ES	
	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
Bluecrop	1,05±0,20a	1,11±0,14a	1,29±0,46a	1,81±0,40a	0,88±0,08a	0,88±0,08a
Misty	1,47±0,19a	1,41±0,12a	1,51±0,34a	2,28±0,32a	0,76±0,07a	0,78±0,05a
Duke	1,60±0,21a	1,41±0,17a	1,41±0,24a	2,21±0,39a	0,80±0,09a	0,94±0,05a
Fase 2 (30 días)						
Variedad	Nº brotes		Crecimiento de brotes en cm		Tasa de proliferación	
	Promedio ± ES		Promedio ± ES		Promedio ± ES	
	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
Bluecrop	5,20±1,29a	5,50±0,98a	4,88±1,67a	3,23±0,77a	1,42±0,27a	1,13±0,17a
Misty	5,00±0,69a	5,22±0,49a	3,16±0,86a	3,11±0,53a	0,97±0,14a	1,23±0,08a
Duke	7,00±0,97a	7,00±1,25a	3,85±1,10a	3,60±1,02a	1,02±0,26a	1,17±0,25a

Letras iguales en la misma fila indica que no existen diferencias significativas con $p < 0,05$. ES: error estándar.

Estos resultados estarían indicando que la acción de la oscuridad aplicada a los explantes durante un período de tiempo a inicio de la brotación, no tendría un mayor efecto en el desarrollo y proliferación de brotes. Sin embargo, se observó una tendencia a una mejor

respuesta al tratamiento oscuridad en las variedades Misty y Duke, en la calidad de los explantes obtenidos (Figura 2).

Se puede observar que para estas dos variedades el comportamiento de los explantes sometidos a oscuridad presentó un mejor desarrollo, más regular y de mejor vigor. Además este comportamiento se refleja en las tasas de establecimiento y proliferación obtenidas en el Cuadro 4.

La variedad Bluecrop presentó un comportamiento indiferente a la oscuridad, presentando un buen desarrollo y crecimiento de brotes en ambos tratamiento (Figura 2), resultado que se reflejó en tasas similares de establecimiento (Cuadro 4).

Esta tendencia coincide con el trabajo realizado por Erig y Schuch (2005), en el cual sometieron a oscuridad durante 7 días explantes del cultivar Delite, logrando disminuir el porcentaje de explantes necrosados, y así obtener una mejor tasa de sobrevivencia de brotes.



Figura 2. Explantes en medio de multiplicación después de 10 días de realizado el primer repique finalizado los tratamientos en la etapa de establecimiento. Efecto de la luz y oscuridad en el crecimiento y desarrollo de los explantes, traducido en una mayor sobrevivencia (tasa de establecimiento de explantes).

Es probable que la dificultad para medir parámetros objetivos durante el crecimiento de los explantes en cultivo *in vitro*, reflejado en la alta variabilidad de los datos obtenidos, dan como consecuencia una no significancia estadística de los resultados.

Ensayo de multiplicación in vitro

Analizando el efecto de cuatro pH distintos en los medios de cultivo en la etapa de multiplicación, no se observaron diferencias significativas en los parámetros evaluados para las variedades Bluecrop, Misty y Duke (Cuadro 5). Este resultado demuestra que el efecto de los distintos pH en estudio no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento y desarrollo de los brotes en las tres variedades.

Cuadro 5. Número, crecimiento y tasa de proliferación de brotes a distintos pH en los medios de cultivo.

Variedad Bluecrop			
Tratamiento	Nº brotes Promedio ± ES	Crecimiento de brotes en cm Promedio ± ES	Tasa de proliferación Promedio ± ES
pH 5,0	4,50 ± 0,64a	3,15 ± 2,00a	0,90 ± 0,12a
pH 5,3	4,25 ± 1,65a	1,93 ± 1,76a	0,85 ± 0,33a
pH 5,7	3,25 ± 1,18a	1,77 ± 0,58a	0,65 ± 0,23a
pH 6,0	1,50 ± 1,19a	1,32 ± 0,69a	0,30 ± 0,23a
Variedad Misty			
Tratamiento	Nº brotes Promedio ± ES	Crecimiento de brotes en cm Promedio ± ES	Tasa de proliferación Promedio ± ES
pH 5,0	6,00 ± 1,00a	2,90 ± 1,14a	1,20 ± 0,20a
pH 5,3	5,50 ± 0,95a	2,55 ± 0,62a	1,10 ± 0,19a
pH 5,7	4,25 ± 1,18a	1,35 ± 0,57a	0,85 ± 0,23 a
pH 6,0	2,75 ± 1,03a	1,00 ± 0,44a	0,55 ± 0,20a
Variedad Duke			
Tratamiento	Nº brotes Promedio ± ES	Crecimiento de brotes en cm Promedio ± ES	Tasa de proliferación Promedio ± ES
pH 5,0	10,00 ± 2,12a	6,93 ± 2,75a	2,00 ± 0,42a
pH 5,3	7,25 ± 0,46a	4,82 ± 1,05a	1,45 ± 0,18a
pH 5,7	5,00 ± 1,47a	4,17 ± 2,75a	1,00 ± 0,29a
pH 6,0	3,50 ± 2,06a	3,80 ± 1,34a	0,70 ± 0,41a

Letras iguales en la misma columna para cada variedad indican que no existen diferencias significativas con $p < 0,05$.

ES: error estándar.

Al igual que en el ensayo anterior aún cuando no existieron diferencias significativas se observa una tendencia positiva al crecimiento de brotes y tasa de proliferación a pH 5,0-5,3, al comparar con pH 5,7 - 6,0 que presentó menor crecimiento y en algunos casos muerte de explantes. Esta respuesta se repitió en las tres variedades (Figura 3).

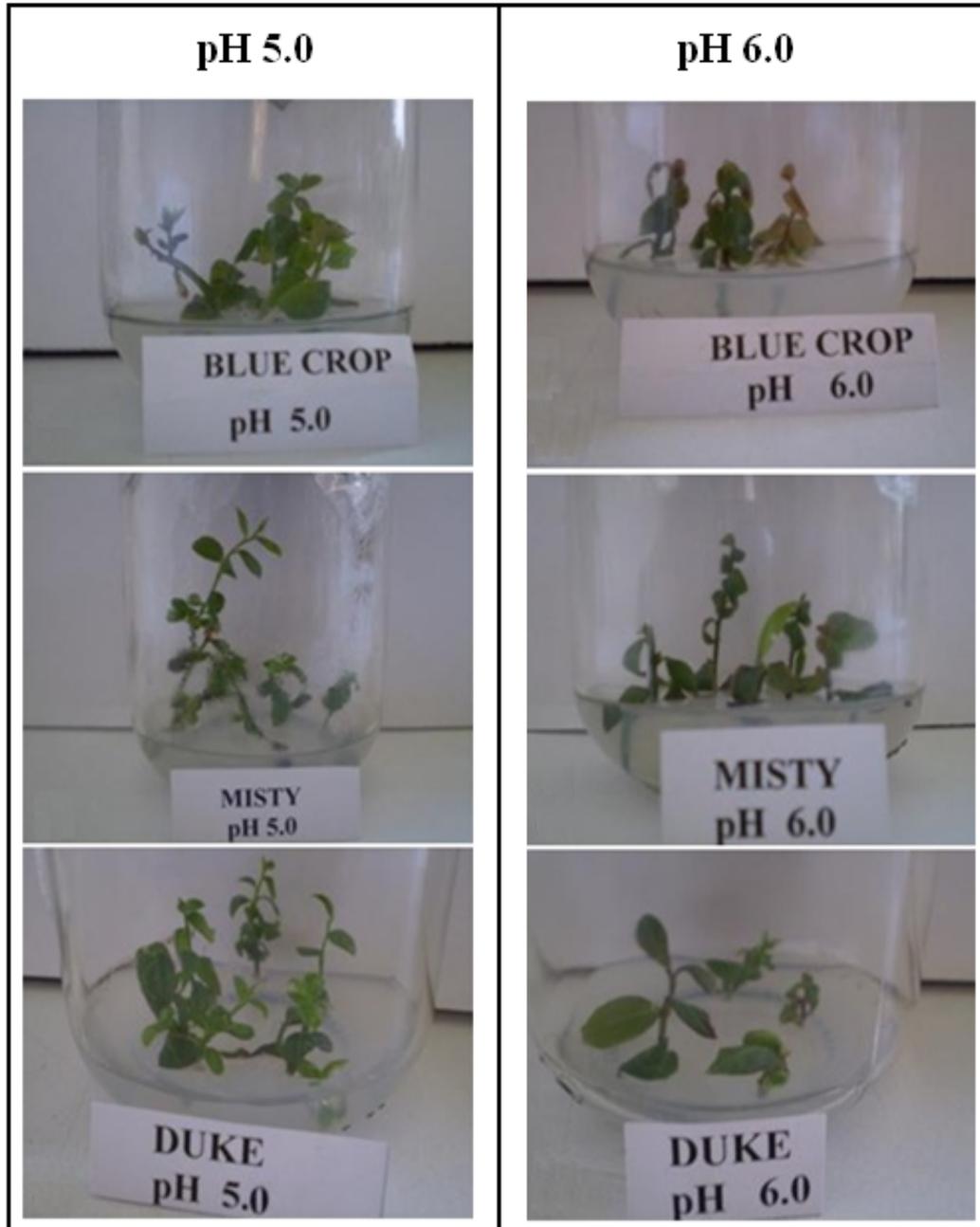


Figura 3. Efecto del pH en el crecimiento y desarrollo de los brotes a los 30 días de subcultivo en medios de multiplicación con los distintos tratamientos de pH. Diferencias de brotación y crecimiento, a pH 5,0 y pH 6,0 en las tres variedades en estudio.

Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por Ostrolucká *et al.*, (2004) donde se determinó que las plantas de arándanos tienen un mayor desarrollo a pH ácidos. Además, se determinó que el cultivar Duke presentó diferencias de intensidad de brotación según el pH del medio de cultivo, para el cual determinó que a pH 5,0 la proliferación de brotes fue mayor.

Probablemente la dificultad para medir parámetros objetivos durante esta etapa, sumado a que los rangos de pH evaluados fueron muy estrechos, y la alta variabilidad de los datos obtenidos en cada parámetro evaluado, arrojó la no significancia estadística para los tratamientos en estudio. Si los rangos de pH en estudio fueran más distanciados quizás se observaría una diferencia significativa marcada.

Ensayo de aclimatación

Vigor de los brotes

Se observó la condición y vigor de los brotes antes de finalizar su tratamiento in vitro (Figura 4). Los brotes sometidos a pre-aclimatación durante 60 días (T3 y T4) lograron una mayor longitud, vigor y tamaño de hojas, comparado a los brotes que permanecieron 30 días (T1 y T2) en pre-aclimatación, además no se observó un efecto de la adición de agua destilada sobre el medio de cultivo en el desarrollo de los brotes. Resultados presentados en la Figura 4.

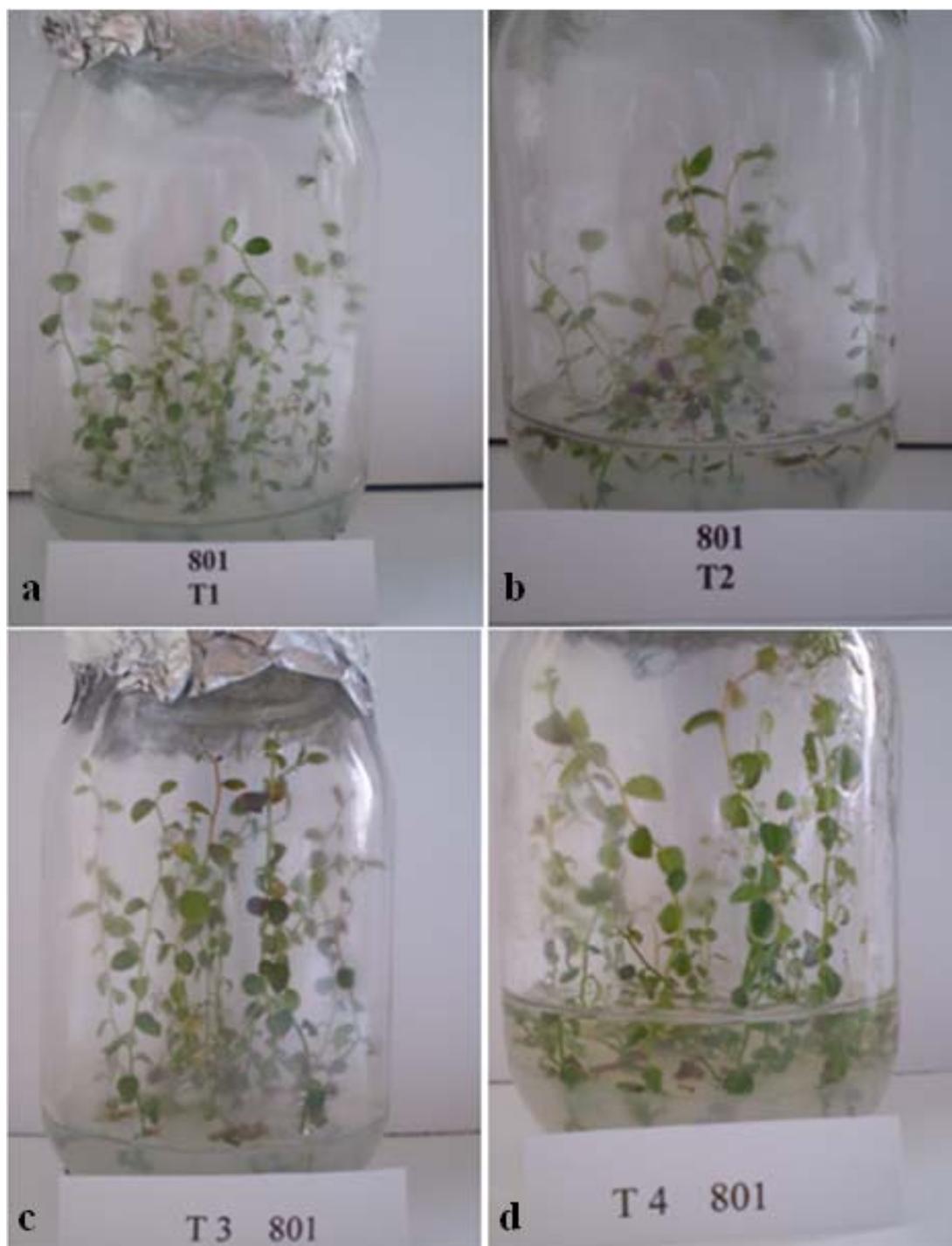


Figura 4. Desarrollo de brotes in vitro de la variedad Bluecrop, finalizado el tiempo de cada tratamiento de pre-aclimatación in vitro. a) 30 días en medio s/regulador de crecimiento b) 30 días en medio s/regulador de crecimiento y últimos 10 días se agregó 20 cc de agua destilada estéril al medio de cultivo c) 60 días en medio s/regulador de crecimiento d) 60 días en medio s/regulador de crecimiento y últimos 10 días se agregó 20 cc de agua destilada estéril al medio de cultivo.

Una vez terminado el tiempo de cada uno de los tratamientos, se evaluó la condición de los brotes mediante un registro fotográfico (Figura 5) manteniéndose el mismo efecto que las observaciones realizadas *in vitro*, donde T3 y T4 presentan brotes de mayor longitud y vigor.

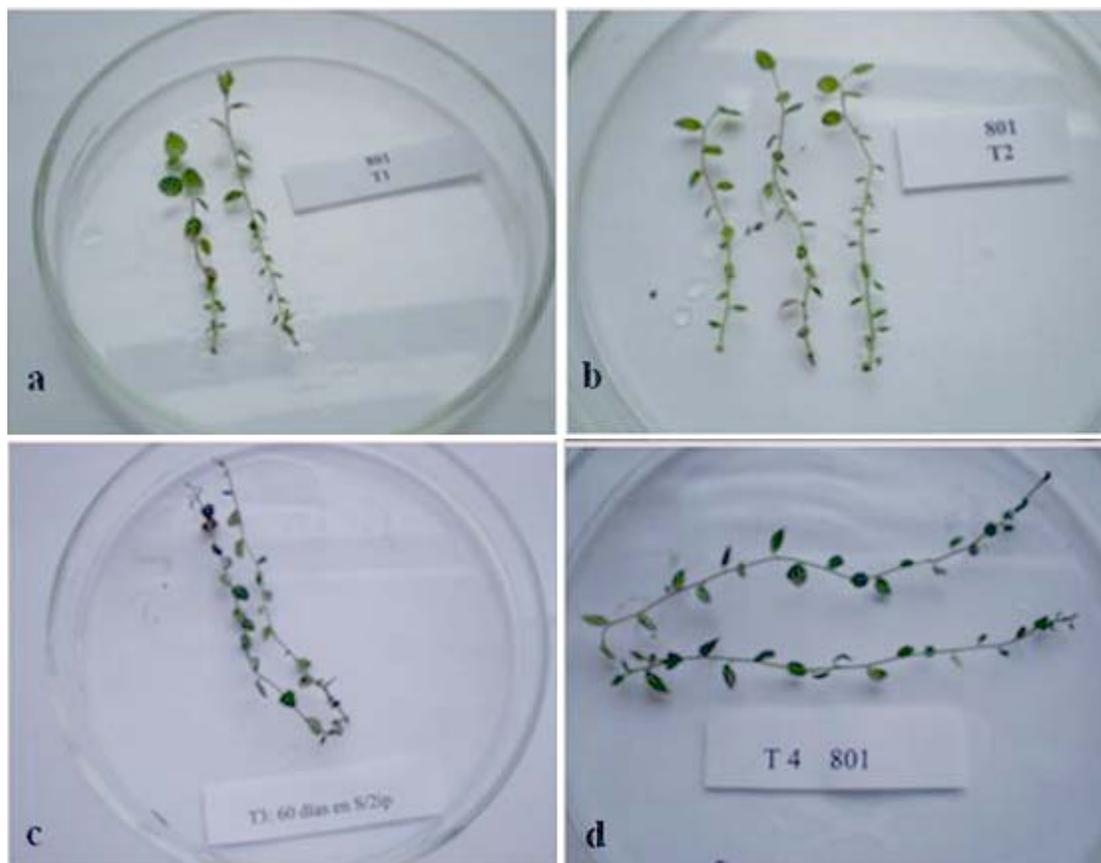


Figura 5. Desarrollo y condición de brotes de la variedad Bluecrop, finalizado el período de pre-aclimatación *in vitro*, antes de realizar la aclimatación en sustrato. Se observa que los brotes de los tratamientos T3 y T4 (c y d) respectivamente presentan mayor longitud y vigor que los brotes de los tratamientos T1 y T2 (a y b) respectivamente.

Es probable que el efecto de 60 días en un medio sin regulador de crecimiento (T3 y T4) produzca la diferencia en el vigor de los brotes, si se compara con un período menor de 30 días (T1 y T2), sin existir una mayor respuesta del agua destilada estéril sobre el medio de cultivo en la condición y desarrollo de los brotes obtenidos.

Presencia o ausencia de raíces

Con el objetivo de evaluar el efecto de los tratamientos de pre-aclimatación in vitro en la aparición de raíces, se contó el número de brotes enraizados a los 10, 20 y 30 días de iniciada la aclimatación en sustrato. En el Cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos en este ensayo.

Cuadro 6. Número de brotes enraizados a los 10, 20 y 30 días de aclimatación.

Tratamientos	Brotos enraizados a los 10 días	Brotos enraizados a los 20 días	Brotos enraizados a los 30 días
	Promedio \pm ES	Promedio \pm ES	Promedio \pm ES
T1	3,75 \pm 0,25b	6,50 \pm 0,28a	8,50 \pm 0,28a
T2	1,75 \pm 0,25a	5,50 \pm 0,64a	6,50 \pm 0,50a
T3	1,75 \pm 0,47a	5,25 \pm 1,03a	7,50 \pm 0,50a
T4	2,25 \pm 0,47ab	5,00 \pm 0,70a	7,25 \pm 0,47a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos, prueba de Tukey ($p < 0,05$).

ES: error estándar.

Se encontró diferencias significativas entre los tratamientos en el número de plantas enraizadas a los 10 días de iniciada la aclimatación. Estas diferencias no se mantuvieron en las evaluaciones realizadas a los 20 y 30 días.

Los resultados obtenidos en el Cuadro 6, no permiten señalar superioridad de un tratamiento sobre otro. Si bien a los 10 días desde el inicio de la aclimatación existe una diferencia significativa, esta no se mantiene en las evaluaciones posteriores. Este resultado pudo ser influenciado por la metodología empleada, al sacar los brotes del sustrato para evaluar la presencia o ausencia de raíz. Además al comparar el efecto de los tratamientos de pre-aclimatación in vitro sobre el enraizamiento de los brotes a los 10 días de evaluación, se observó que los tratamientos T1 y T2 (con 30 días de pre-aclimatación) donde T2 corresponde al tratamiento con agua destilada presentó menor número de brotes enraizados, sin embargo en los tratamientos T3 y T4 (con 60 días de pre-aclimatación), donde T4 corresponde al tratamiento con agua destilada presentó mayor número de brotes enraizados.

Tamaño de raíz v/s vigor de los brotes

Para la evaluación de estos dos parámetros se llevó un registro fotográfico del desarrollo radical a los 10, 20,30 y como última evaluación a los 60 días de iniciada la aclimatación, el cual fue contrastado con el desarrollo que tuvieron los brotes.

Se observó que los tratamientos que implicaron adición de agua destilada estéril sobre el medio de cultivo sin regulador de crecimiento (T2 y T4) presentaron raíces de mayor longitud a los 10 días de evaluación, en tanto que a los 30 días de evaluación se observó un mayor desarrollo radical en los brotes sometidos a 60 días de pre-aclimatación in vitro (T3 y T4) resultados presentados en la Figura 6.

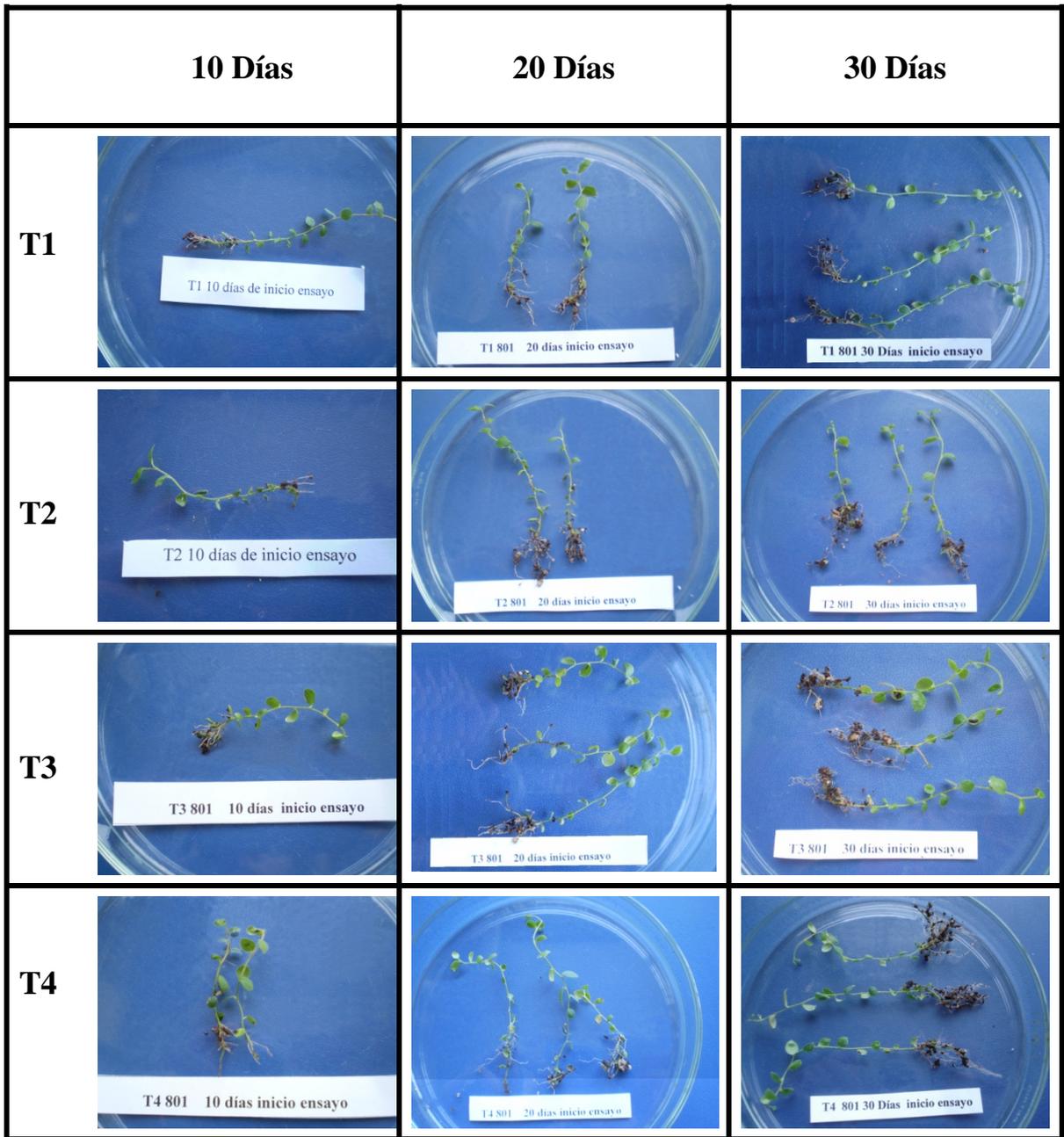


Figura 6. Desarrollo de raíces en los brotes de la variedad Bluecrop, sometidos a 4 condiciones de pre-aclimatación in vitro. Mediciones realizadas a los 10, 20 y 30 días de iniciada la aclimatación en sustrato.

Como se observa en la Figura 6, hay un efecto del periodo de pre-aclimatación in vitro en el desarrollo radical. Es decir, aquellos brotes con un período de 30 días de pre-aclimatación (T1 y T2) tuvieron, después de 30 días de aclimatados en sustrato, un menor desarrollo radical comparado con los brotes con período de pre-aclimatación 60 días (T3 y T4). Las

diferencias no se observan cuando se comparan los tratamientos c/agua destilada estéril y s/agua destilada estéril a los 30 días de aclimatación (T1 c/ T2 y T3 c/ T4). Este efecto pudo ser influenciado por la metodología empleada, al sacar los explantes del sustrato para su evaluación.

En cuanto al desarrollo y vigor de los brotes aclimatados provenientes de los distintos tratamientos de pre-aclimatación in vitro, se observó un mejor desarrollo y condición de los brotes obtenidos de los tratamientos T3 y T4 (60 días de pre-aclimatación in vitro en un medio sin regulador de crecimiento) en el transcurso de las evaluaciones realizadas. Este efecto de los tratamientos de pre-aclimatación in vitro se mantuvo en el tiempo, ya que al evaluar 60 días después de iniciada la aclimatación en sustrato los brotes obtenidos de T3 y T4 presentan mayor longitud, vigor, número y tamaño de hojas, en comparación a los brotes obtenidos de T1 y T2 como se observa en la Figura 7.



Figura 7. Condición y desarrollo de brotes de la variedad Bluecrop, a los 60 días de iniciada la aclimatación en sustrato. Comparación del vigor y desarrollo radical de los brotes provenientes de cada uno de los tratamientos de pre-aclimatación realizados in vitro.

En el trabajo realizado por Smanhotto *et al.*, (2006) sostienen que para obtener una alta tasa de sobrevivencia y explantes enraizados, los brotes deben presentar una condición propicia, de pre-endurecimiento, para aumentar la capacidad fotosintética de los explantes. Se observó que esta condición se obtuvo en los brotes sometidos a mayor tiempo (60 días) en un medio de pre-aclimatación *in vitro*.

El éxito de la aclimatación depende de la tasa de sobrevivencia de los explantes, otorgada por la capacidad de enraizamiento y vigor de los explantes. En este ensayo se obtuvo mayor sobrevivencia de los brotes en aquellos que presentaron mayor vigor, dado por un mayor número y tamaño de hojas, por lo tanto la mayor sobrevivencia de los explantes se podría adjudicar al período de duración de pre-aclimatación *in vitro*, y no al efecto de la adición de agua sobre el medio de cultivo.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y bajo las condiciones en que se realizó esta investigación no es posible concluir que el tratamiento de oscuridad durante un cierto período de tiempo en la etapa de establecimiento, produzca un mayor crecimiento y proliferación de brotes en las tres variedades en estudio. Sin embargo se observó que las variedades Misty y Duke presentaron una tendencia positiva al crecimiento y proliferación de brotes en respuesta a la oscuridad, no así para la variedad Bluecrop que se comportó en forma indiferente a la oscuridad.

En la etapa de multiplicación no es posible concluir que un determinado pH del medio de cultivo, induzca a un mayor crecimiento y proliferación de brotes para las tres variedades en estudio. Sin embargo también se observó un efecto positivo frente a los pH 5,0 -5,3, rango de pH utilizado anteriormente en el protocolo del Laboratorio de Genética Vegetal, Universidad de Chile.

En la aclimatación, el uso de un medio de pre-aclimatación in vitro durante 60 días favoreció el vigor y condición de los explantes, en base al tamaño y número de hojas, reflejado en una mayor sobrevivencia de los brotes aclimatados.

En base a estos resultados no es posible ajustar y mejorar el protocolo de micropropagación de arándanos en cada una de las etapas de este proceso a cada variedad presente en esta investigación. Sin embargo, los tratamientos propuestos en cada una de las etapas de la micropropagación, es decir el uso de un periodo de oscuridad en la etapa de establecimiento, medio de cultivo con pH 5,0-5,3 en la etapa de multiplicación y el uso de un medio de pre-aclimatación durante 60 días permitirían obtener un mayor crecimiento y proliferación de brotes en cada una de las variedades en estudio.

BIBLIOGRAFÍA

Ascough, G.D and Fennell C. 2004. The regulation of plant growth and development in liquid culture. *South African Journal of Botany*. 70 (2): 181-190.

APROA-Agrimed, s.a. Universidad de Chile. Disponible en:
<http://146.83.43.182/aproa/1531/fo-article-68348.pdf>. Leído el 3 marzo 2009.

Bañados, M. 2006. Blueberry Production in South America. *Acta Hort*. 715:165–172.

Brazelton, D. and Strik, B. 2007. Perspective on the U.S. and global blueberry industry. *J. Am. Pom. Soc.* 61:144–147.

Castillo, A. 2004. Propagación de plantas in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Disponible en:
http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf. Leído el 25 de abril de 2007.

Caligari, P.D., Retamales, J.B, y Lobos G.A. 2009. Blueberry Breeding for Chilean Conditions. *Acta Hort*. 810:125-128.

Chandler, C K. and Draper, A. D. 1986. Effect of zeatin and 2ip on shoot proliferation of three high bush blueberry clones in vitro. *HortScience* 21:1065-1066.

Censo Frutícola. 2007. Superficie plantada y Producción. Disponible en:
<http://www.cosechamecanizadearandos.cl/sup.html>. Leído el 4 de noviembre de 2009.

Debnath, S.C. and McRae, K.B. 2001. An efficient in vitro shoot propagation of Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon Ait.*) By Axillary Bud. *In vitro cellular & Developmental biology – plant* 37(2): 243-249.

El- Sheikh, A., Wildung, D.K., Luby, J.J., Sargaent, K.L. and Read, P.E. 1996. Long term effects of propagation by tissue culture or softwood single-node cuttings on growth habit, yield, and berry weight of ‘Northblue’ blueberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121 (2): 239-342.

Erig, A.C. and Schuch, M.W. 2005. Estabelecimento in Vitro de Mirtilo a partir de segmentos nodais. *Scientia Agraria* 6(1-2): 91-96.

Erig, A.C. and Schuch, M.W. 2006. Fatores Que afetam a Multiplicação in vitro de Mirtilo. *Scientia Agraria* 7(1-2): 83-88.

Espinosa, J. González, O. Sánchez, R. Afanador, L. y Correa, G. 2005. Potencial de propagación *in vitro* para el tomate de árbol partenocárpico *Cyphandra betacea* Cav. (Sendt). Rev.Fac. Nal.Agr. Medellín 58(1):2685-2695.

González, M.V., Lopez, M., Valdes, A.E., y Ordas, R.J. 2000. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. Annals of applied Biology 137(1):73-78.

Jiménez, E. 1995. Propagación “*in vitro*” de la caña de azúcar (*Saccharum spp* Híbrido). Tesis (en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas) santa clara, Cuba. Universidad Central de las Villas. 90 p.

Kobayashi, S., Amaki, W. and Higuchi, H. 1995, Effects of medium pH shoot growth and flowering of *Torenia* internodal stem segments *in vitro*. Environmental control in plant tissue culture. Acta Hort. 393: 135-138.

Klerk, G. 2000. Rooting treatment and the *ex vitro* performance of micropropagated plants. Acta Hort: 530:277-288.

Lloyd, G., and McCown, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proc. Int.plant prop. Soc. 30:421-427.

Miller, S., Rawnsley, E., George, J., and Patel, N. 2006. A Comparison of Blueberry Propagation Techniques Used in New Zealand Acta. Hort.715:397-399.

Muñoz, C. 1991. Propagación de las especies de Arándano y cultivares en Chile. Pp 50. In: Seminario Internacional Arándano. Talca, Chile 3-4 octubre, 1991.Universidad de Talca. Talca, Chile.

ODEPA, 2007. Situación de los mercados de exportación de tres frutas en expansión: paltas, arándanos y cerezas. Disponible en: <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servlet/contenidos.ServletDetallesScr;jsessionid=79E757B33C12EAA0341794691BD18508?idcla=2&idcat=5&idn=2017>. Leído el 15 diciembre 2008.

Ostrolucká, M.G., Libiaková, G., Ondrusková, E., and Gajdosová, E. 2004. *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. Acta universitatis Latviensis, Biology. 676: 207-212.

Poirot, P. 1991. Factores que influyen en la micropropagación del Arándano ojo de conejo (*Vaccinium ashei* read). Memoria Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 90 p.

Read, P.E., Hartley, C.A., Sandahl, J.G. and Wildung, D.K. 1987. Field performance of *in vitro* propagated blueberries. Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 37:450-452.

Sánchez, M., y Salaverría, J. 2004. Control de la Oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*fragaria anannassa duch.*) Revista Científica UDO Agrícola 4(1):21-26.

Sosa, F. 2004. Propagación in vitro de la Heliconia Standleyi Macbride. Tesis (Máster en Ciencias Agrarias) La Habana, Cuba. Universidad Agraria de la Habana, Facultad de Ciencias agrarias. 2004 .79 p.

Smanhotto, C., Schuchovski, A., Biasi, L. and Telles, C. 2006. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. Rev. Bras. Frutic, Jaboticabal - SP. 28(3): 473-476.

Sudsuki, F. 2002. Cultivo de frutales menores. Editorial universitaria. Santiago. 184p.

Swartz, H.J. and Lindstrom, J.T. 1986. Small fruit and grape tissue from 1980 to 1985: commercialization of the technique. Tissue Culture as a plant production system for horticultural crops. MartinusNijhoff Publishers. Dordrecht (Netherlands). 201-220 p.

Velázquez, M., González, A., y Mata, F. 2004. Tipo de sombreado y tiempo de crecimiento de brotes laterales sobre la viabilidad de explantes de *Annona muricata L.* Rev. Fac. Agron. Disponible en: http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037878182004000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es. Leído el 9 mayo 2007.

Wolfe, D.E., Eck, P., and Chin, C.K. 1983. Evaluation of 7 media for micropropagation of highbush blueberry. HortScience 18:703-705.

Zimmerman, R.H., and Broome, O.C. 1980. Blueberry micropropagation, p. 54-59. In proc. Of the conf. On Nursery production of fruit plants trough tissue culture-applications and feasibility. 135P.

Zhidong, Z., Haiguang L., Lin, W., and Yadong L. 2006. Technical System of Blueberry Micropropagation in China. Acta Hort. 715:421-423.

ANEXOS

Anexo I. Protocolo de Micropropagación WPM

Macronutrientes Lloyd & McCown WPM	1X(mg/L)	Solución Madre	Para 1L de medio de cultivo agregar
Macro WPM			10 cc
NH ₄ NO ₃	400	40	
MgSO ₄ *7H ₂ O	370	37	
KH ₂ PO ₄	170	17	
K ₂ SO ₄	990	99	
Macro 2			9.4 cc
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	556	59	
Macro 3			2.2 cc
CaCl ₂	96	44	
Microelementos WPM			10 cc
MnSO ₄ *H ₂ O	16.9	1.69	
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8.6	0.86	
H ₃ BO ₃	6.2	0.62	
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.25	0.025	
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.25	0.025	
Vitaminas WPM			10 cc
Acido Nicotínico	0.5	0.05	
Piridoxina HCl	0.5	0.05	
Tiamina	1	0.1	
Inositol	100	10	
Glicina (1L)	2	0.2	10 cc
Quelato de Hierro MS			10 cc
Na ₂ EDTA	37.3	3.73	
FESO ₄ *7H ₂ O	27.8	2.78	
Reguladores de crecimiento			
2ip	7	0.1	70 cc
Sacarosa	30 g		30 g
Agar	6 g		6 g
Ph	5.3		5.3

Fuente: Laboratorio de Genética Vegetal, Universidad de Chile.