



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**Facultad de Agrobiología
"Presidente Juárez"**

**Programa Institucional de Maestría
en Ciencias Biológicas**

**CULTIVO *in vitro* DE ARÁNDANO variedad Biloxi (*Vaccinium corymbosum* L.):
ESTABLECIMIENTO ASÉPTICO, BALANCE DE FITOHORMONAS Y NITRÓGENO.**

TESIS
QUE PRESENTA
LENICA ROSARIO TECANHUEY FERNÁNDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEL AREA TEMATICA FISIOLOGÍA Y GENETICA VEGETAL

**ASESOR: DR. HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE
COASESOR: DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS
DR. JOSÉ LUCIANO MORALES GARCÍA
DRA. MARÍA DE LAS NIEVES RODRÍGUEZ MENDOZA
DR. NICOLÁS GUTIÉRREZ RANGEL**

Uruapan Michoacán, Agosto 2012.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	iii
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN GENERAL	x
SUMARY	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPÍTULO I IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS PARA EL CULTIVO <i>in vitro</i> DE ARÁNDANO VARIEDAD BILOXI	6
CAPÍTULO II BALANCE DE FITORREGULADORES EN EL CULTIVO <i>in vitro</i> DE ARÁNDANO (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) VARIEDAD BILOXI	29
CAPÍTULO III REQUERIMIENTO DE NITRÓGENO Y RELACIÓN AMONIO: NITRATO EN EL CULTIVO <i>in vitro</i> DE ARÁNDANO (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) VARIEDAD BILOXI	76

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS PARA EL CULTIVO *in vitro* DE ARÁNDANO VARIEDAD BILOXI

	Página
Cuadro 1. Descripción de los tratamientos, ingredientes activos de los fungicidas, modo de acción y dosis utilizadas para el control de hongos fitopatógenos en el cultivo <i>in vitro</i> de arándano.	15
Cuadro 2. Análisis de la varianza para el efecto de los fungicidas y para tasa de crecimiento de <i>Alternaria sp.</i> , determinado en el cultivo <i>in vitro</i> de arándano.	20
Cuadro 3. Análisis de la varianza para el efecto de los fungicidas y para tasa de crecimiento de <i>Pestalotiopsis sp.</i> , determinado en el cultivo <i>in vitro</i> de arándano.	20
Cuadro 4. Análisis de la varianza para el efecto de los fungicidas y para la tasa de crecimiento de <i>Epicoccum sp.</i> , determinado en el cultivo <i>in vitro</i> de arándano.	20
Cuadro 5. Tasas de crecimiento (cm día ⁻¹) de <i>Alternaria sp.</i> , <i>Pestalotiopsis sp.</i> y <i>Epicoccum sp.</i> , en el bioensayo <i>in vitro</i> con diferentes fungicidas en un lapso de 28 días	21

CAPÍTULO II. BALANCE DE FITORREGULADORES EN EL CULTIVO *in vitro* DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L.) VARIEDAD BILOXI

	Página
Cuadro 1. Tratamientos utilizados para determinar el efecto de la concentración de 6-(γ,γ -dimetilalilamino) purina (2iP) con kinetina para inducir formación de brotes adventicios de <i>Vaccinium corymbosum</i> L.	34
Cuadro 2. Tratamientos utilizados para determinar el efecto de la concentración de 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-(γ,γ -dimetilalilamino) purina (2iP) bajo efecto de la temperatura para inducir la formación de callo embriogénico a partir de explantes de hoja en arándano 'Biloxi.	35
Cuadro 3. Tratamientos utilizados para determinar el efecto de la concentración de 2,4-D y 2iP con dos tipos de explante para inducir la formación de callo embriogénico a partir de explantes de hoja en arándano variedad Biloxi.	36
Cuadro 4. Tratamientos utilizados para determinar el efecto de la concentración de 2,4-D y 2iP bajo efecto de la temperatura para inducir la formación de callo embriogénico a partir de explantes de hoja en arándano variedad Biloxi.	36

Cuadro 5.	Tratamientos utilizados para determinar el efecto de la concentración de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) con kinetina para la proliferación de callo embriogénico de <i>Vaccinium corymbosum</i> L.	39
Cuadro 6.	Cuadrados medios para peso, diámetro y necrosis del callo, obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los fitorreguladores y la temperatura en la inducción de callo proembriogénico.	41
Cuadro 7.	Cuadrados medios para área (%) de callo friable y color del callo, obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los fitorreguladores y la temperatura en la inducción de callo proembriogénico.	41
Cuadro 8.	Cuadrados medios para peso, diámetro y necrosis del callo, obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los fitorreguladores y tipo de explante en la inducción de callo proembriogénico.	50
Cuadro 9.	Cuadrados medios para área (%) de callo friable y color del callo, obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los fitorreguladores y tipo de explante en la inducción de callo proembriogénico de arándano variedad Biloxi..	50
Cuadro 10.	Cuadrados medios para peso, diámetro y necrosis del callo, obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los fitorreguladores y tipo de explante en la inducción de callo proembriogénico.	57
Cuadro 11.	Cuadrados medios para área (%) de callo friable y color del callo, obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los fitorreguladores y tipo de explante en la inducción de callo proembriogénico.	58

CAPÍTULO III. REQUERIMIENTO DE NITRÓGENO Y RELACIÓN AMONIO: NITRATO EN EL CULTIVO *in vitro* DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L.) VARIEDAD BILOXI

	Páginas
Cuadro 1. Tratamientos establecidos para medir el efecto de la concentración de nitrógeno total en la inducción de callo embriogénico en arándano variedad Biloxi.	81
Cuadro 2. Formulación de medios de cultivo MS (Murashigue y Skoog, 1962) con diferentes relaciones amonio: nitrato utilizados para evaluar la inducción de callo embriogénico en arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.).	83
Cuadro 3. Cuadrados medios para RE, PC y DC obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de diferentes dosis de nitrógeno y hormonas (2,4-D y 2iP), sobre la inducción de callo proembriogénico de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.).	85
Cuadro 4. Cuadrados medios para CF, OC y CC obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de diferentes dosis de nitrógeno y hormonas (2,4-D y 2iP) sobre la inducción de callo proembriogénico de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.).	85
Cuadro 5. Estadísticos simples obtenidos del análisis de varianza en una vía para evaluar la inducción de callo proembriogénico con base en el efecto de 2,4-D, 2iP y Nitrógeno a partir de explantes de hoja, en el cultivo <i>in vitro</i> de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) variedad Biloxi.	86
Cuadro 6. Cuadrados medios para RE, PC y DC obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto la relación amonio: nitrato en la inducción de callo proembriogénico.	87
Cuadro 7. Cuadrados medios para OC y CC obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto la relación amonio: nitrato en la inducción de callo proembriogénico.	95
Cuadro 8. Estadísticos simples obtenidos del análisis de varianza en una vía para determinar la inducción de callo proembriogénico con base en el efecto de 2,4-D, 2iP y la relación amonio: nitrato, a partir de explantes de hoja, en el cultivo <i>in vitro</i> de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) variedad Biloxi.	96
Cuadro 9. Estadísticos simples obtenidos del análisis de varianza en una vía para determinar la inducción de callo proembriogénico con base en el efecto de 2,4-D, 2iP y la relación amonio: nitrato, a partir de explantes de hoja, en el cultivo <i>in vitro</i> de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) variedad Biloxi	96

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS PARA EL CULTIVO *in vitro* DE ARÁNDANO VARIEDAD BILOXI

	Página
Figura 1. Fotografías del bioensayo para el control de hongos fitopatógenos en arándano. Fungicidas (A) . Discos de papel impregnados con el respectivo fungicida durante 3 minutos (B) . Caja Petri con medio PDA y los cuatro fungicidas utilizados (C) . Caja Petri con el micelio del hongo en el centro de la caja (D) .	15
Figura 2. Fotografía que muestra el desarrollo de las colonias (A,B,C) y conidios con septos transversales y longitudinales (D) , conidios oscuros formado por varias células hialinas y apéndices apicales (E) , conidios oscuros formado por varias células (dictiosporas) (F) , de los hongos <i>Alternaria sp.</i> , <i>Pestalotiopsis sp.</i> , <i>Epicoccum sp.</i> , identificados en el cultivo <i>in vitro</i> de arándano.	17
Figura 3. Efecto de los diferentes fungicidas sobre la tasa de crecimiento del micelio de los hongos fitopatógenos <i>Alternaria sp.</i> (A) , <i>Pestalotiopsis sp.</i> (B) y <i>Epicoccum sp.</i> (C) identificados en el cultivo <i>in vitro</i> de arándano a los 7, 14, 21 y 28 días en medio PDA a 27 °C.	22
Figura 4. Fotografía del bioensayo para el control de <i>Alternaria sp.</i> (A) , <i>Pestalotiopsis sp.</i> (B) y <i>Epicoccum sp.</i> (C) , en arándano bajo condiciones <i>in vitro</i> .	24
Figura 5. Fotografía de la contaminación de los explantes de hoja en el cultivo <i>in vitro</i> de arándano antes (A) y después (B) de la aplicación del fungicida ciprodinil y fludioxonil a las plantas donadoras de explantes.	25

CAPÍTULO II. BALANCE DE FITORREGULADORES EN EL CULTIVO *in vitro* DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L.) VARIEDAD BILOXI

	Página
Figura 1. Fotografía que muestra un brote (A) y dos brotes (B) adventicios de explantes de hoja completa con yema en medio WPM con 2 mg L ⁻¹ 2iP y 0.5 mg L ⁻¹ de kinetina, cuatro meses después de subcultivados.	40
Figura 2. Fotografías que muestran los callos a partir de explantes de hoja bajo 3°C (A) y 25°C (A) en la inducción de callo proembriogénico de arándano variedad Biloxi.	43
Figura 3. Efecto de 2,4-D, 2iP y la temperatura en el peso del callo a partir de explantes de hoja de arándano variedad Biloxi.	43

Figura 4.	Efecto de 2,4-D en el diámetro del callo a partir de explantes de hoja de arándano variedad Biloxi.	45
Figura 5.	Efecto de la temperatura en el diámetro del callo a partir de explantes de hoja de arándano variedad Biloxi.	46
Figura 6	Efecto de 2iP en el área (%) friable del callo a partir de explantes de hoja de arándano variedad Biloxi.	46
Figura 7.	Efecto de la temperatura en el área (%) de oxidación del callo a partir de explantes de hoja de arándano variedad Biloxi.	47
Figura 8.	Fotografía que muestra la coloración amarillo claro del callo a 3°C (A) y coloración verde claro a 25 °C (B), en la inducción de callo embriogénico de arándano variedad Biloxi.	48
Figura 9.	Fotografía que muestra los callos producidos en explantes de hoja (A) y yema (B) en la inducción de callo proembriogénico de arándano variedad Biloxi.	51
Figura 10.	Efecto de 2,4-D, 2iP y tipo de explantes en el peso del callo a partir de explantes de hoja de arándano variedad Biloxi.	51
Figura 11.	Efecto de 2,4-D, 2iP y tipo de explantes en el diámetro del callo, en la inducción de callo embriogénico de arándano variedad Biloxi.	53
Figura 12.	Efecto de 2iP y tipo de explantes en el área (%) de necrosis de callo en la inducción de callo embriogénico de arándano variedad Biloxi.	54
Figura 13.	Efecto de 2,4-D, 2iP y tipo de explantes en el área (%) de callo friable en la inducción de callo embriogénico de arándano variedad Biloxi.	55
Figura 14.	Fotografía que muestra las tonalidades de los callos en los explantes de hoja y tallo en la inducción de callo proembriogénico en arándano variedad Biloxi.	56
Figura 15.	Fotografía que muestra los callos producidos en explantes de hoja por acción de las 2,4-D con 2iP (A), Kinetina (B) y BA (C), en la inducción de callo proembriogénico de arándano variedad Biloxi.	59
Figura 16.	Efecto de las citocininas en el peso del callo, en la inducción del proceso embriogénico de arándano variedad Biloxi.	60
Figura 17.	Efecto de 2,4-D en el diámetro del callo embriogénico de arándano variedad Biloxi.	61

Figura 18.	Efecto de diferentes citocininas en el diámetro del callo, en la inducción de callo embriogénico de arándano variedad Biloxi.	62
Figura 19.	Efecto de 2,4-D y la combinación de diferentes citocininas y concentración, en el área (%) de necrosis del callo peso del callo, en la inducción del proceso embriogénico.	63
Figura 20.	Efecto de 2,4-D y la combinación de diferentes citocininas (2iP, Kinetina, BA) y concentración, en el porcentaje área friable del callo peso del callo, en la inducción del proceso embriogénico.	64
Figura 21.	Coloración del callo por efecto de diferentes citocininas (2iP, Kinetina, BA) en la inducción de callo embriogénico de arándano, variedad Biloxi.	65
Figura 22.	Callo proembriogénico de arándano variedad Biloxi, producido en explantes de hoja completa y yema. Interacción de 0.2 mg L ⁻¹ 2,4-D (A). Interacción de 0.2 mg L ⁻¹ 2,4-D con 0.5 mg L ⁻¹ kinetina (B). Interacción de 0.2 mg L ⁻¹ 2,4-D con 1.0 mg L ⁻¹ kinetina (C). Interacción de 0.2 mg L ⁻¹ 2,4-D con 2.0 mg L ⁻¹ kinetina (D).	67

CAPÍTULO III. REQUERIMIENTO DE NITRÓGENO Y RELACIÓN AMONIO: NITRATO EN EL CULTIVO *in vitro* DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L.) VARIEDAD BILOXI

Figura 1.	Fotografías que muestran la variabilidad de los callos inducidos en explantes de hoja de arándano por la acción de nitrógeno, 2,4-D y 2iP a las tres semanas (1A), seis semanas (1B) y ocho semanas (1C).	87
Figura 2.	Efecto de la Interacción de 2,4-D con nitrógeno en la respuesta del explante de hoja de arándano para formar callo; la evaluación se hizo a los 90 días.	89
Figura 3.	Efecto del nitrógeno el peso del callo en el explantes de hoja de arándano.	90
Figura 4.	Efecto del nitrógeno en el diámetro del callo en los explantes de hoja de arándano.	91
Figura 5.	Efecto del 2,4-D, 2iP y nitrógeno en el área (%) de oxidación del callo en explantes de hoja de arándano.	92
Figura 6.	Efecto del 2,4-D, 2iP y nitrógeno en el área (%) de callo friable a partir de explantes de hoja de arándano.	93
Figura 7.	Coloración de los callos por efecto del nitrógeno total en la inducción de callo pro embriogénico de aránadano variedad	94

Biloxi.

- Figura 8.** Fotografías de la variabilidad del crecimiento y desarrollo del callo en explantes de hoja de arándano a los 50 días a las diferentes relaciones amonio: nitrato 0: 3 (A y E), 1: 2 (B y F), 2:1 (C y G), 3:0 (D y H). La concentración de nitrógeno total es de 15 mM las fotografías en la parte superior y 30 mM en las de la parte inferior. **97**
- Figura 9.** Efecto del nitrógeno y de la relación amonio: nitrato en el peso del callo al utilizar explantes de hoja de arándano para la inducción de callo proembriogénico. **99**
- Figura 10.** Efecto del nitrógeno la relación amonio: nitrato en el diámetro del callo al utilizar explantes de hoja de arándano para la inducción de callo proembriogénico. **100**
- Figura 11.** Efecto de la relación amonio: nitrato en el porcentaje de oxidación del callo al utilizar explantes de hoja de arándano para la inducción de callo proembriogénico. **101**
- Figura 12.** Coloración de los callos por efecto de la relación amonio: nitrato en la inducción de callo pro embriogénico de arándano variedad Biloxi. **102**

RESUMEN GENERAL

En México se ha empezado a producir arándano en los estados de Jalisco y Michoacán, que ofertan frutos en fresco a EUA, Canadá y algunos países europeos, cuando éstos se encuentran en su estación invernal y no pueden abastecerse con su producción local. El cultivo *in vitro* de arándano de la variedad Biloxi, es una alternativa para contribuir a solucionar la problemática antes indicada, ya que es posible obtener clones de arándano, con alto potencial productivo. La presente investigación consta de tres partes, en el Capítulo I se aborda la problemática de la presencia de agentes fitopatógenos en el cultivo de arándano que afecta a la asepsia del cultivo *in vitro*. De acuerdo con las claves de Barnett y Hunter (1998), los hongos fitopatógenos identificados fueron *Alternaria sp.*, *Epicoccum sp.* y *Pestalotiopsis sp.* Los tres hongos fueron aislados de los explantes de tallo y hoja de arándano, estos hongos son clasificados dentro del grupo de los Deuteromicetes (Agrios, 1997). El fungicida que logró la mayor inhibición de estos hongos fue la combinación de los ingredientes activos ciprodinil y fludioxonil al utilizar la dosis de 1 mg L^{-1} . El Capítulo II se enfoca a determinar el efecto de la temperatura, fitorreguladores y tipos de explantes (hoja y yema) para la inducción de embriones somáticos de arándano (*Vaccinium corumbosum* L.) variedad Biloxi. Los resultados obtenidos permitieron concluir que es posible la inducción de callo proembriogénico en arándano variedad Biloxi a partir de explantes de hoja en el medio WPMM adicionado con 0.5 mg L^{-1} de 2,4-D y con 0.5 mg L^{-1} de 2iP. En el Capítulo III, se analizan los requerimientos de nitrógeno total, relaciones amonio: nitrato y fitorreguladores para la inducción de embriones somáticos; se tomó como base el medio de cultivo Murashigue & Skoog (1962), además de evaluar la relación amonio: nitrato necesaria para este proceso. La inducción de callo proembriogénico en el cultivo *in vitro* de arándano a partir de explantes de hoja se logró con la adición de 1 mg L^{-1} de 2,4-D y 0.5 mg L^{-1} de 2iP con un balance de 30 mM de nitrógeno total. De la misma manera, la inducción de callo proembriogénico fue lograda con el mismo balance hormonal y con una relación amonio: nitrato 1:2.

SUMMARY

Mexico has started producing blueberries in the states of Jalisco and Michoacan, which offer fresh fruits in USA, Canada and some European countries, where they are in their winter season and can not stock up with local production. *In vitro* culture of Biloxi blueberry variety is an alternative to help solve the problems indicated above, since it is possible to grow blueberry plants with high production potential. This research consists of three parts, in Chapter I deals with the problem of the presence of plant pathogens in growing blueberry asepsis affecting *in vitro* culture. According Barnett and Hunter's keys (1998), the phytopathogenic fungus *Alternaria* sp., *Epicoccum* spp., and *Pestalotiopsis* sp. were identified. The three fungi were isolated from stem and leaf explants of cranberry, these fungi are classified within the group of Deuteromycetes (Agrios, 1997). The fungicide that achieved the highest inhibition of the fungi was the combination of active ingredients cyprodinil and fludioxonil when using a dose of 1 mg L⁻¹. Chapter II focuses on determining the effect of temperature, plant growth substances and types of explants (leaf and bud) for induction of somatic embryos of blueberry (*Vaccinium corumbosum* L.) variety Biloxi. The results led to the conclusion that it is possible the induction of pro embriogenic callus in Biloxi blueberry variety from leaf explants in WPMM medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D and 0.5 mg L⁻¹ 2iP. In Chapter III, we analyze the total nitrogen requirements, ammonium: nitrate relationships and plant growth regulators for the induction of somatic embryos, it was based on the culture of Murashigue&Skoog (1962), and to assess the ammonium: nitrate relationship necessary for this process. Pro embriogenic callus induction in vitro culture from blueberry leaf explants was achieved with the addition of 1 mg L⁻¹ 2,4-D and 0.5 mg L⁻¹ of 2iP stock with 30 mM total nitrogen. Similarly, pro embriogenic callus induction was achieved with the same hormonal balance 1:2 ammonium: nitrate relationship.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El Arándano o “blueberry” (*Vaccinium corymbosum L.*) pertenece al grupo de frutales menores conocidos como frutillas por su forma y tamaño característico junto a frambuesa, zarzamora, fresa y grosella. Estados Unidos de América (EUA) es el principal productor, consumidor, exportador e importador de arándano del mundo, y con Canadá, abarcan 80 % de la producción seguidos de Chile, Argentina, Alemania, Francia, Polonia, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda. La superficie cultivada de arándano a nivel mundial es de 85,000 ha para consumo fresco, mientras que el mercado de importación de arándano fresco representa cifras de 120 millones de dólares americanos (US\$), considerando las especies silvestres y cultivadas (FAO, 2008).

En México se ha empezado a producir arándano en los estados de Jalisco y Michoacán, que ofertan frutos en fresco a EUA, Canadá y algunos países europeos, cuando éstos se encuentran en su estación invernal y no pueden abastecerse con su producción local, lo que genera un nicho de mercado muy atractivo. De acuerdo con información de productores de la región occidente del país, los arándanos son pagados entre 20 US \$ kg⁻¹ en octubre y de 14 a 18 US \$ kg⁻¹ en noviembre (Uribe, 2010); el incremento del valor en el mercado de esta frutilla fue 356 % en 2009 (SAGARPA, 2010).

En los Reyes, Michoacán este cultivo se introdujo desde el año 2002 aproximadamente; a partir de plantas reproducidas por estacas, adquiridas por empresas chilenas. Esta forma de propagación representa una desventaja porque es lenta y no abastece la demanda de los productores. El costo de una planta oscila entre los US\$ 2.5 a US\$ 4 y se requieren alrededor de 6 mil plantas ha⁻¹. (Comunicación personal Miguel Ángel

Marina Gallardo, 17 enero 2012). Como es un cultivo de reciente introducción se requieren técnicas alternativas a las convencionales para producir plantas que cubran la demanda de los productores en la región. Aunque existen informes sobre propagación *in vitro* de arándano (Zhang *et al.*, 2006), estas variedades no son aptas para su cultivo en Michoacán, ya que requieren en promedio 800 horas frío.

El cultivo *in vitro* de arándano de la variedad Biloxi, es una alternativa para contribuir a solucionar la problemática antes indicada, ya que es posible obtener clones de arándano, con alto potencial productivo en un tiempo menor durante todo el año, independientemente del factor climático; además, es posible obtener, mantener y manejar cultivos libres de enfermedades y patógenos. La variedad “Biloxi”, requiere 400 horas frío, presenta maduración temprana, alta calidad de fruta y gran sabor. Las plantas con estas características adquieren un alto valor en el mercado y son requeridas por aquellos viveristas, a pesar de su costo, para la venta de esquejes con o sin raíz que se obtienen del cultivo de estas plantas madres libres de fitopatógenos (Estopá, 2005).

La presente investigación consta de tres partes, en el capítulo I se aborda la problemática de la presencia de agentes fitopatógenos en el cultivo de arándano que afecta a la asepsia del cultivo *in vitro*; por lo que fue necesario aislar, identificar y controlar los hongos fitopatógenos, así como el proceso de desinfección de los explantes; ya que para el establecimiento del cultivo aséptico de arándano y su micropropagación, se requieren plantas sanas que estén bajo un control fitosanitario, ya que los fitopatógenos que se encuentren en la planta madre seleccionada, se manifestarán en el cultivo *in vitro* (Uribe *et al.*, 2008), debido a que el medio de cultivo

utilizado para la micropropagación contiene los macro y micronutrientes que los hongos necesitan para crecer (Alcantar, 2010).

El capítulo II se enfoca al efecto de la temperatura, fitorreguladores y tipos de explantes (hoja y yema) para la inducción de embriones somáticos de arándano (*Vaccinium corumbosum* L.) variedad Biloxi. Entre los principales reguladores del crecimiento vegetal se encuentran las auxinas, estas promueven el crecimiento por aumento de la expansión celular (Azcón-Bieto *et al.*, 2008), también es común que se apliquen citocininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos (Reed y Abdelnour, 1991). La temperatura es otro factor importante que afecta el crecimiento de tejidos *in vitro*, es el control de la temperatura de incubación, debido a que influye directamente sobre la regulación del metabolismo primario o secundario, dirigiendo entre otros, el desarrollo de los procesos fisiológicos (Plucknett y Williams, 1992). Entre los factores que determinan la respuesta del cultivo *in vitro*, tanto en las diferencias en el metabolismo vegetal, como en los niveles endógenos de nutrimento, se puede señalar a la especie y el tipo de explante (Cunha, 1999). En especies leñosas, se ha observado que el uso de tejidos juveniles tiene mayor éxito en las diversas técnicas de cultivo de tejidos.

Finalmente, en el capítulo III se analizan los requerimientos de nitrógeno total, relaciones amonio: nitrato y fitorreguladores para la inducción de embriones somáticos; se utilizó como base el medio de cultivo Murashigue & Skoog (1962), además de evaluar la relación amonio: nitrato necesaria para este proceso.

Con base en la importancia que representa el cultivo de arándano variedad Biloxi, y además de la escasa información generada sobre la embriogénesis somática de este cultivo, en el presente trabajo se planteó lo siguiente:

Hipótesis

El cultivo *in vitro* de arándano variedad Biloxi (*Vaccinium corymbosum L.*) es susceptible a la contaminación fúngica, al balance hormonal, los requerimientos de nitrógeno y de la relación amonio: nitrato.

Objetivo General:

Establecer las condiciones de asepsia, hormonales y nutrimentales que permitan el cultivo *in vitro* de arándano de la variedad Biloxi (*Vaccinium corymbosum L.*).

Objetivos Específicos:

Identificar y controlar los fitopatógenos presentes en el cultivo *in vitro* de arándano variedad Biloxi.

Establecer las condiciones asépticas para el cultivo *in vitro* de arándano variedad Biloxi.

Evaluar la respuesta morfogénica de diferentes combinaciones y concentraciones hormonales para la inducción de brotes adventicios

Evaluar la respuesta morfogénica de diferentes combinaciones y concentraciones hormonales para la inducción de embriones somáticos.

Evaluar la respuesta de nitrógeno en la inducción de embriones somáticos.

Evaluar la respuesta de la relación nitrato- amonio en la inducción de embriones somáticos.

LITERATURA CITADA

- Agrios G N (1997)** Plant pathology. Academic Press, New York. 635 pp.
- Alcantar G G y L Trejo-Tellez (2009)** Nutrición de Cultivos. Biblioteca Básica de Agricultura. 454 pp.
- Azcon-Bieto J, M Talon (2001)** Fundamentos de Fisiología Vegetal. Edit. Interamericana. Mc Graw-Hill. Madrid. 651 pp.
- Barnett H L y B Hunter (1998)** Illustred Genera of Imperfect Fungi.4 Edition. Burges Publishing Company, Minnesota, Minnesota. USA. 128, 152, 204 pp.
- Cunha C A (1999)** Métodos de propagación En: cultivo, agroindustria e economía de Brasil. Métodos de comunicación para la transferencia de tecnología. p.105-138.
- Estopá B M (2005)** El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. Revista Electrónica. Extra 2005 viveros. España. 50-56.
- FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2008)** Estadística producción arándano. <http://www.fao.org/corp/statistics/es/>. Consultada 4 de Abril 2011.
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Pieta D, E Patkowska, A Pastucha (2004)** The effect of biopreparations on the growth and development of certain fungi pathogenic towards papilionaceous plants. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 3(2):171-177.
- Plucknett D I, J T Williams (1992)** Los bancos genéticos y la alimentación mundial. Instituto Iberoamericano de Cooperación para la Agricultura Tropical San José Costa Rica. Pp. 25-125.
- Reed B M, A Abdelnour-Esquivel (1991)** The use of zeatina to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *HortScience* 26(10):1320-1322.
- SAGARPA (2010)** INFOGRAMAS. http://www.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/260810_Berrys_Def3.pdf (Última revisión 17 Enero 2012).
- Uribe M E, C Delaveau, M Garcés, R Escobar (2008)** Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque* 29 (1): 58-64.
- Zhang Z H, Liu L, Wu Y. Li (2006)** Technical System of Blueberry Micropropagation in China. *Actahorticulturae* 715: 421-426.

CAPÍTULO I

IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS PARA EL CULTIVO *in vitro* DE ARÁNDANO VARIEDAD BILOXI

RESUMEN

El arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.) es muy utilizado en Estados Unidos de América y Europa debido a su peculiar sabor y sus propiedades terapéuticas (Kalt, 1997), esta frutilla fue introducida en Michoacán desde 2003 en los municipios de Los Reyes y Zamora, posteriormente en 2009 en Tangancícuaro y Yurécuaro. La creciente demanda de planta de arándano para cultivo no es satisfecha, debido a que la propagación vegetativa por estacas es lenta y también propaga las enfermedades. Lo anterior, obliga a implementar técnicas alternativas como el cultivo *in vitro* de tejidos y órganos vegetales, que permita obtener plantas libres de patógenos. El objetivo de este trabajo fue aislar, identificar y controlar los hongos fitopatógenos presentes en los tejidos del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) como base para establecer el cultivo *in vitro* libre de patógenos.

Con apoyo de las claves de Barnett y Hunter (1998) se identificaron los hongos fitopatógenos *Alternaria* sp., *Pestalotia* sp y *Epicoccum* sp.; se hizo un bioensayo del control químico de estos hongos con los fungicidas ciprodinil y fludioxinil, mfenoxam y mancozeb, carbendazim y tionafano metílico. Los resultados demostraron que el fungicida sistémico ciprodinil y fludioxinil inhibieron el crecimiento de los tres hongos con una concentración de 1 g L⁻¹. Finalmente, se establecieron las condiciones asépticas necesarias para el cultivo *in vitro* de arándano variedad Biloxi.

INTRODUCCIÓN

Por ser el arándano, un cultivo reciente en México, no se cuenta con suficiente información sobre el control de enfermedades en esta región; sin embargo, la información generada en otros países sirve como base para el estudio en esta área (Wright *et al.*, 1998).

Para el establecimiento del cultivo aséptico de arándano y su micropropagación, se requieren plantas sanas que estén bajo un control fitosanitario, ya que los fitopatógenos que se encuentren en la planta madre seleccionada, se manifestarán en el cultivo *in vitro* (Uribe *et al.*, 2008), debido a que el medio de cultivo utilizado para la micropropagación contiene los macro y micronutrientes que los hongos necesitan para crecer (Alcantar, 2010).

Los hongos fitopatógenos aislados del cultivo de arándano en huertos de Argentina fueron *Alternaria tenuísima*, *Pestalotiopsis guepini*, *Pucciniastrum vaccinii*, *Fusarium sp.*, *Phytophthora sp.*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pythium sp.*, *Stemphyllium sp.*, *Sclerotinia sclerotiorum*. (Wright y Cotta, 1996, 2003, 1998, 2004), *Pestalotiopsis sp.* (Scherm *et al.*, 2007). Sin embargo, en este trabajo de investigación sólo se indicarán a *Alternaria sp.*, *Pestalotiopsis sp.* y *Epiccocum sp.*, estos hongos son clasificados dentro del grupo de los Deuteromicetos, que también son llamados hongos imperfectos, ya que no tienen o no se conoce su fase formadora de ascas (fase sexual), algunos tienen la fase asexual de los ascomicetos y su fase sexual no se conoce y pudiera ser que la hayan perdido y tengan un ciclo parasexual. Son hongos tan simples que es difícil elegir una característica para diferenciarlos y finalmente se hace con base en la formación y forma de los conidios. Los conidios se caracterizan por su pigmentación, cuando están inmaduros, no tienen coloración y cuando maduran adquieren una

pigmentación. También se clasifican dependiendo de la forma, el número de células y de tabiques o septos observados (Agrios, 1997).

El hongo fitopatógeno *Alternaria sp.*, forma conidióforos de color oscuro, cortos y alargados, por lo general tienen una cadena simple o ramificada de conidios. Los conidios de *Alternaria sp.*, tienen septos transversales y longitudinales y se les conoce como dictiosporas, además son pardos y picudos. Nacen por la brotación apical de una célula conidiógena o de la espora anterior, dando lugar a una cadena que suele ramificarse si un conidio produce más de un brote (Barnet y Hunter 1998).

Este hongo es frecuentemente indicado en literatura fitopatológica como causante de manchas en hojas y frutos o pudrición de frutos y se comporta como un parásito que penetra por heridas. La penetración directa y estomatal ocurre cuando el hospedero está fisiológicamente debilitado. Los conidios de *Alternaria sp.*, se encuentran suspendidas en el aire con mayor frecuencia; puede haber una penetración sub-epidérmica si toleran las aplicaciones de los fungicidas (Lacey, 1989).

El hongo *Alternaria sp.*, junto con otras especies de los géneros *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium* y *Verticillium*; son difícil de erradicar, si es que no se efectúa el tratamiento adecuado, ya que pueden permanecer aún después de la cosecha y causar lesiones físicas que alteran su aspecto.

La esporulación de *Alternaria sp.*, es óptima a 27 °C pero es inhibida por debajo de 15 °C o por encima de 33 °C, aunque el rango de crecimiento está entre 0 y 35 °C (Lacey 1989). A una temperatura de entre los 20 °C y 25 °C este hongo produce metabolitos secundarios como altenueno, alternariol, alternariol monometil-éter, altertoxina I, ácido tenuazónico (Moss, 1991) y fitotoxinas, como la tentoxina, un tetrapéptido cíclico (Minoletti *et al.*, 2000), lo que provoca la rápida oxidación de los explantes y brotes en el

cultivo *in vitro* de arándano. En relación al empleo de fungicidas, se ha demostrado que especies, géneros y taxones superiores de hongos han manifestado sensibilidad diferencial a derivados de las dicarboximidias (Iprodione), en combinación con los ditiocarbamatos, como mancozeb (Muiño *et al.*, 2010). El espectro de acción de las dicarboximidias es contra representantes de diferentes géneros de hongos, como *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Monilinia*, *Alternaria*, *Sclerotium* y *Phoma* (Pommer y Lorenz, 1995); sin embargo, se han reportado casos de posible resistencia de *Alternaria alternata* hacia este tipo de fungicida (MacPhee, 1980). El fungicida iprodione en combinación con mancozeb para el control de *Alternaria spp.*, mostraron niveles de control satisfactorios con índices de ataque del 20, 25, 29 y 20% al finalizar el ciclo del cultivo para papa, tomate, cebolla y ajo, respectivamente, además de que estos fungicidas en alternancia evitan el desarrollo de resistencia (Muiño *et al.*, 2010). En otras investigaciones para el control químico de *Alternaria alternata*, tanto *in vitro* como a nivel de campo, se reporta que la combinación de los fungicidas difenoconazole y cyprodinil, ambos no utilizados en el control químico de tomate (*Lycopersicum* (Mill.)), estos fueron los mejores evaluados, y lograron aumentar el control en todas las evaluaciones realizadas (Melo, 1998).

El hongo *Pestalotiopsis sp.*, se caracteriza por tener acérvulos oscuros, discoides o con forma de cojín. Los conidios son delgados y simples. El conidio es oscuro, unicelular, hialínico al final de la célula, elipsoide y formar apéndices apicales. Las heridas en los tejidos favorecen la entrada de *Pestalotiopsis sp.*, al igual como sucede con la diseminación de muchos hongos, ya que penetra sub-epidérmicamente por los tejidos de la planta. El hongo *Pestalotia vaccinii*, se enlista como agente causal de enfermedades en arándano en Chile, por lo que la División de Protección Agrícola y

Forestal en este país pide en los requisitos para la certificación fitosanitaria para la exportación de arándanos de China hacia Chile, mantener un monitoreo de la ausencia del patógeno (SAG, 2011).

Se han reportado en Chile estudios sobre la susceptibilidad de siete cultivares de arándano a enfermedades producidas por *Pestalotiopsis sp.*, en base a los resultados obtenidos concluyeron que *Pestalotiopsis clavispora*, es un importante patógeno causante de cancrrosis y muerte regresiva del arándano en viveros y huertos comerciales. En el control químico, los resultados mostraron que este hongo fue sensible a la acción *in vitro* de los fungicidas fludioxonil y pyraclostrobin en la variedad Misty, que mostraron 100 % de inhibición micelial, además determinaron la dosis media (0.5 a 0.58 mg L⁻¹) efectiva de estos productos (Espinosa, 2008).

El hongo *Epicoccum sp.*, se caracteriza por tener esporodoquios oscuros, en forma de cojín, de tamaño variable. Los conidióforos son compactos, oscuros y cortos. El conidio es oscuro, unicelular (dictiosporo) y globoso. El género *Epicoccum* contiene una sola especie. Es un hongo mitospórico distribuido extensamente y aislado comúnmente de aire, del suelo, de una gran variedad de plantas e insectos, de la piel humana, de textiles, etc. Se considera saprófito, en algunos casos se presenta como oportunista, siendo un invasor secundario de plantas (William *et al.*, 1976). En el género *Vaccinium*, se ha encontrado en hojas (Szmagara, 2007) y se encuentra en la lista de patógenos que infectan a arándano en la costa British Columbia, Canadá (Verma, 2006).

En estudios *in vitro*, sobre el efecto de varios fungicidas sobre enfermedades en las ramas del melocotón, se encontró que *Epicoccum nigrum*, fue menos sensible a benomilo (ED50= 2.26 ppm), tiofanato metílico (ED50= 9.61 ppm) y vinclozolina

(ED50=3.89), en comparación con *Penicillium frequentans* y *Penicillium purpurogenum* (De Cal y Pacual, 1994).

La efectividad de los cuatros fungicidas seleccionados se debe a la acción que estos ejercen sobre el patógeno en cuestión. Se ha utilizado ciprodinil y fludioxonil en el control de *Alternaria alternata* en los cultivos de uvas de mesa y vides viníferas (Syngenta, 2007); para *Pestalotiopsis sp.*, se han utilizado otros fungicidas como mancozeb 80%, Mencozeb combinado con cymoxynily difenoconazole¹(Younis *et al.*,2004); para *Epicoccum sp.*, no existen reportes del tratamiento con este fungicida o alguno de sus componentes.

Los mecanismos de acción de los fungicidas utilizados se describen a continuación: ciprodinil y fludioxinil. Es un fungicida sistémico y de contacto que actúa por la combinación de dos sustancias activas; ciprodinil, inhibe la biosíntesis de metionina y la secreción de enzimas hidrolíticas, actúa inhibiendo la germinación de las esporas, el crecimiento del tubo germinativo y el crecimiento micelial del hongo, (fludioxonil) actúa después de la germinación de esporas, inhibiendo el proceso de penetración y de crecimiento micelial del hongo, también tiene efecto limitado sobre la esporulación. El ciprodinil pertenece al grupo químico de las anilopirimidinas y el fludioxonil pertenece al grupo químico de los fenilpirroles (Syngenta, 2007).

mefenoxam y mancozeb: Es una mezcla de fungicidas con distinto modo de acción; mefenoxam actúa en forma sistémica penetrando en la planta, donde se trasloca por el sistema vascular a otros tejidos para inhibir la síntesis de ARN ribosomal a nivel celular, previniendo la liberación, y germinación de zoosporas e inhibiendo el crecimiento micelial del hongo, y la germinación de esporangios y haustorios secundarios en los

¹ 3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il] fenil-4-clorofenil éter

tejidos de la planta. El otro, clorotalonil, es un fungicida de contacto que permanece sobre el follaje, impidiendo que las esporas germinen y penetren para causar nuevas reinfecciones, ya que inhibe la respiración celular de los patógenos al no formar el ATP, por lo tanto las esporas se vuelven inviables. Esta conjunción de características ayuda a combatir las enfermedades y así mismo ayuda a retardar la pérdida de sensibilidad de los patógenos a los fungicidas. El mefenoxam pertenece a las fenilamidas del grupo químico de las acilalaninas y el clorotalonil al grupo multisitio (Syngenta, 2007).

Carbendazim. Es un fungicida que impide la división celular y la formación del uso acromático durante la profase, es también un inhibidor de la formación de la tubulina. Necesita para poder actuar, que los hongos estén en crecimiento (mitosis).

Tionafano metílico. Es un fungicida sistémico presentado en forma de polvo humectable para aplicar en aspersion al suelo. Resulta eficaz en el control preventivo y, hasta la aparición de los primeros síntomas, curativo de diversas enfermedades producidas por hongos endoparásitos y ectoparásitos.

METODOLOGÍA

Localización del sitio experimental. El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de la Unidad de Investigaciones Avanzadas en Agrobiotecnología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en Uruapan, Michoacán.

Aislamiento, purificación e identificación de hongos fitopatógenos. Los hongos fitopatógenos se aislaron de dos fuentes; la primera de ellas, a partir de hojas y tallos de plantas cultivadas en invernadero y la segunda a partir de explantes de hoja y tallo cultivados en el medio MS *in vitro*. Se desinfectaron con hipoclorito de sodio. Las muestras de hoja y tallo provenientes del invernadero se limpiaron con jabón y se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio 33 % v/v (6 % I. A.) durante 2 minutos, posteriormente se cortaron en secciones de 1 cm² con la ayuda de un bisturí. Las muestras del cultivo *in vitro*, se obtuvieron directamente de los explantes con presencia de micelio fúngico.

Los hongos aislados tanto de hojas como de los explantes del cultivo *in vitro* se colocaron en el centro de la caja Petri conteniendo 20 mL de la solución de medio de cultivo PDA (papa, dextrosa, agar). A los diez días después de la siembra, cada tipo de micelio desarrollado se subcultivó bajo las condiciones antes indicadas. Finalmente de las colonias puras se hicieron preparaciones fijas mediante la técnica de raspadura con aguja de disección para su observación en el microscopio compuesto (Carl Zeiss) con aumento de 10x y 43x. La determinación de las características morfológicas, crecimiento de micelio y esporulación se efectuaron de acuerdo con las claves de Barnett y Hunter (1998).

Bioensayo para el control de hongos fitopatógenos en arándano. El bioensayo para el control químico de los hongos fitopatógenos aislados se llevó a cabo en la campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas. En el centro de una caja Petri con el medio PDA, se colocó un disco de agar de 5 mm de diámetro con el hongo puro, rodeado por cuatro discos de papel filtro en posición equidistante al centro. Los discos, fueron impregnados con los fungicidas seleccionados con base en los fitopatógenos identificados en las plantas, durante un lapso de tres minutos (Figura 1). Los hongos fueron incubados a una temperatura de 27 °C bajo condiciones de oscuridad continua, hasta que la primera cepa llenó el espacio de la caja Petri. La evaluación de la tasa de crecimiento de las colonias, se obtuvo mediante la medición del diámetro de crecimiento de las colonias cada 24 horas, hasta que la primera cepa cubrió el espacio de la caja Petri. La tasa de crecimiento (mm), se obtuvo mediante la siguiente relación $T_{\text{rec}} = \frac{D_f - D_i}{t}$, en donde: D_f =Diámetro final de crecimiento de la colonia, D_i = Diámetro inicial (disco de PDA con micelio), durante el tiempo de crecimiento del hongo, en días.

El bioensayo para el control de los hongos fitopatógenos se estableció bajo un diseño completamente al azar con cinco repeticiones, los tratamientos y las dosis utilizadas se describen en el Cuadro 1. Los datos obtenidos del bioensayo, se analizaron mediante un análisis de varianza en una vía mediante el procedimiento PROC ANOVA, en donde se detectaron diferencias estadísticas significativas se practicaron pruebas de comparación de medias de Tukey ($p \geq 0.05$) entre tratamientos; para esto último, se utilizó el programa de computo estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2004).

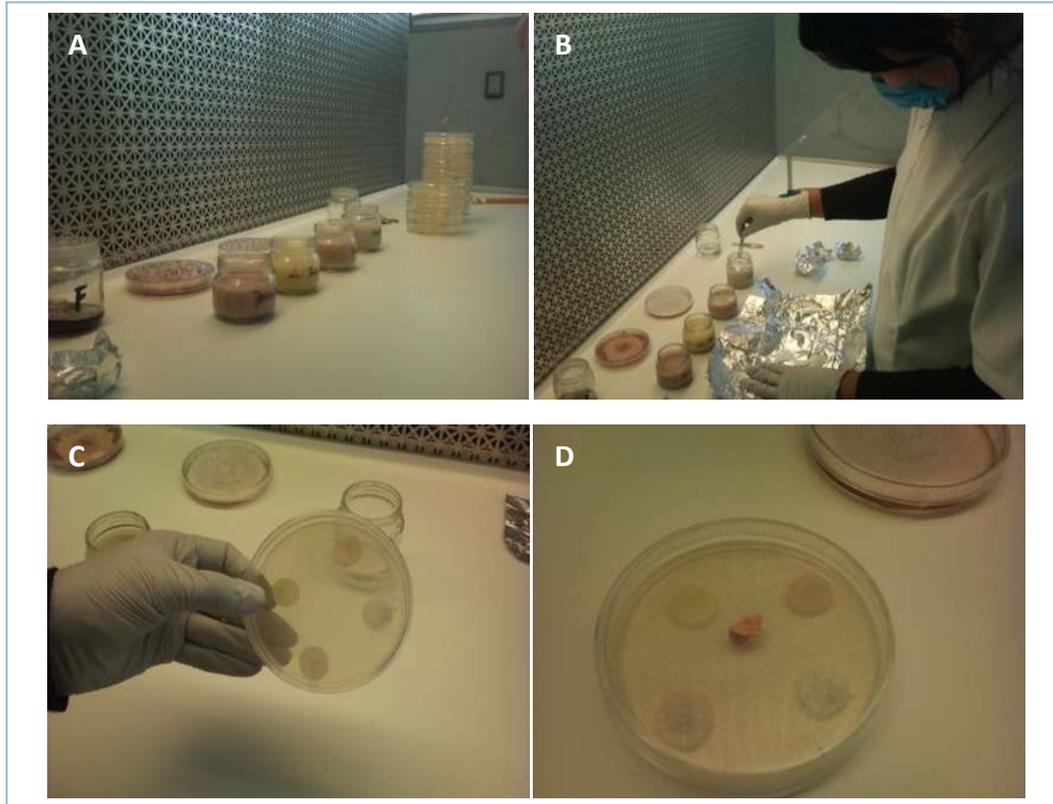


Figura 1. Fotografías del bioensayo para el control de hongos fitopatógenos en arándano. Fungicidas (A). Discos de papel impregnados con el respectivo fungicida, durante 3 min (B). Caja Petri con medio PDA y los cuatro fungicidas utilizados (C). Caja Petri con el micelio del hongo en el centro de la caja (D).

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos, ingredientes activos de los fungicidas, modo de acción y dosis utilizadas para el control de hongos fitopatógenos en el cultivo *in vitro* de arándano.

Tratamiento	Ingrediente Activo	Modo de acción	Dosis
1 ^{2*}	Tiofanato metílico	Sistémico	1 g L ⁻¹
2*	Carbendazim: metilbenzimidazol-2-ilcarbamato	Sistémico	3 mL L ⁻¹
3*	Ciprodinil: 4-ciclopropil-6-metil-N-fenil-2-pirimidinamina. Fludioxonil 4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-il) -1H-pirrol-3-carbonitrilo.	Sistémico y Contacto	1 g L ⁻¹

^{2*} Nombre comerciales: 1=Cercobin[®] M. 2=Derosal[®] 500 D. 3=Switch[®]. 4= Ridomil[®] MZ 68 PH Gold.

4*	Mefenoxam (Metalaxil-M):(R)-2-(2,6-dimetilfenil) metoxiacetilamino propionato de metilo Mancozeb: ión zinc y etilen bis ditiocarbamato de manganeso	Sistémico y Contacto	3 g L ⁻¹
----	--	-------------------------	---------------------

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de fitopatógenos presentes en el cultivo *in vitro* de arándano variedad Biloxi. La identificación de los hongos fitopatógenos se logró por medio de las muestras provenientes del invernadero y del micelio que creció en los explantes cultivados *in vitro*; de estos dos tipos de muestras, se aislaron tres tipos de micelios: los de color verde pardo esponjoso (60 %), de color blanco esponjoso (30 %) y anaranjado brillante (10 %).

De acuerdo con las claves de Barnet y Hunter (1998), los hongos fitopatógenos identificados fueron *Alternaria sp.*, *Epicoccum sp.* y *Pestalotiopsis sp.* Los tres hongos fueron aislados de los explantes de tallo y hoja de arándano, aunque el porcentaje de presencia de *Alternaria sp.*, fue mayor en hojas (60 %) que en tallo (50 %); en el caso de *Epicoccum sp.*, la presencia fue inversa, 40 % en tallo y 30 % en hojas; *Pestalotiopsis sp.*, se encontró en la misma cantidad en los dos tipos de explante (10 %).

El hongo *Alternaria sp.*, se caracterizó por formar conidióforos de color oscuro, cortos y alargados y conidios de cadena simple (Barnet y Hunter, 1998). Además se distinguió por producir micelio abundante, algodonoso, con una coloración que va desde el blanco al verde grisáceo y oscuro en el centro (**Figura 2A y 2D**), fue el primer hongo en colonizar totalmente la caja Petri (15 días); estas características son concordantes con lo reportado Andrews (1992). Este investigador identificó dos especies en cereales, *A. alternata* que formó colonias algodonosas, elevadas, con micelio gris verdoso y conidios

negro parduzco, y *A. infectoria* que formó colonias pardo aceituna a negro parduzco, chatas y algodonosas, a veces con fascículos y esporulación moderada, micelio gris y con frecuencia un pigmento soluble verde amarillento.

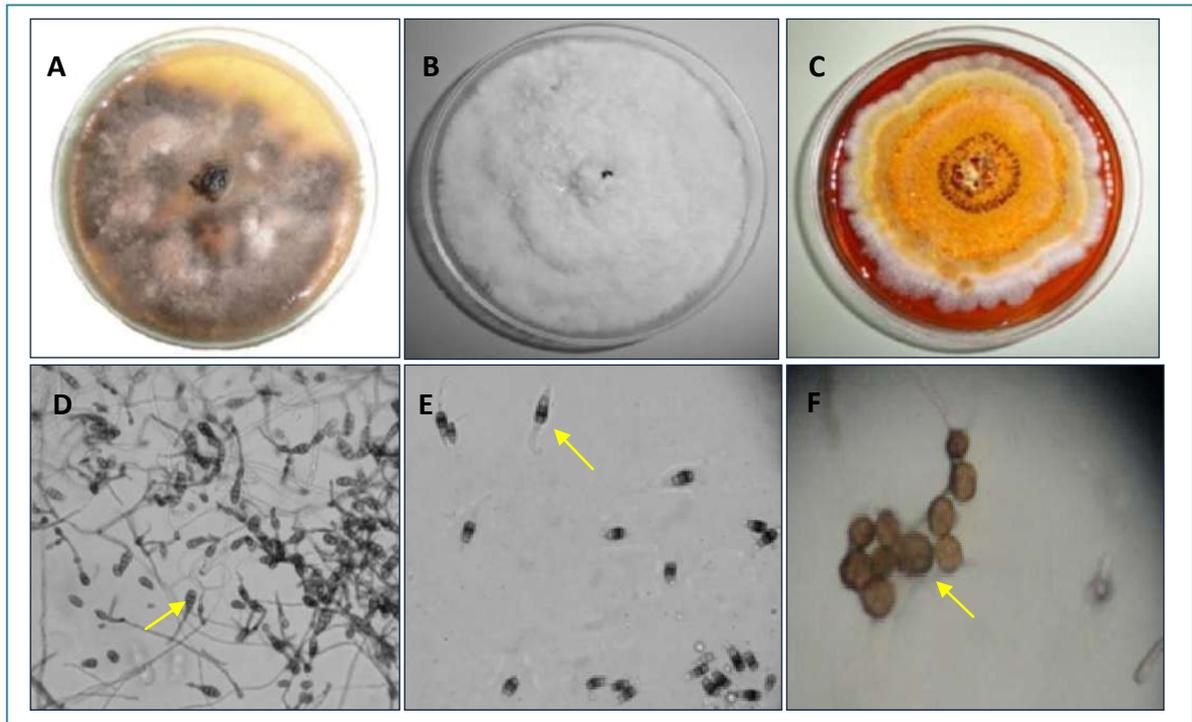


Figura 2. Fotografía que muestra el desarrollo de las colonias (**A,B,C**) y conidios con septos transversales y longitudinales (**D**), conidios oscuros formado por varias células hialinas y apéndices apicales (**E**), conidios oscuros formado por varias células (dictiosporas) (**F**), de los hongos *Alternaria sp.*, *Pestalotiopsis sp.*, *Epicoccum sp.*, identificados en el cultivo *in vitro* de arándano.

Las características taxonómicas del hongo *Pestalotiopsis sp.*, aislado de tejidos de arándano, concuerdan con lo descrito por Steyaert (1949, 1953a,b, 1961) (**Figura 2B, 2E**), que de acuerdo con las claves de Barnett y Hunter (1998) mostraron tener un acérvulo oscuro y discoide, conidios delgados, simples y oscuro, es un organismo unicelular, hialínico al final de la célula y forma apéndices apicales. El micelio que creció en la caja Petri fue de color blanco esponjoso.

El hongo *Pestalotiopsis sp.*, está asociado a infecciones secundarias en zonas de hojas infectadas previamente por *Gloeosporium* (hongo que causa la enfermedad más común y grave junto con *Septoria sp.*). Esta enfermedad foliar se caracterizó por producir manchas en hojas tipo antracnosis, pero en poca frecuencia y de manera inconsistente. La variedad Highbush (*Vaccinium corymbosum*), fue la variedad más susceptible a la infección por estos hongos en comparación con la variedad Ojo de Conejo (*Vaccinium myrtillus*) en los dos años de evaluación (Schermet *et al.*, 2007).

El primer informe de *Pestalotiopsis sp.*, encontrado en arándano en China, fue en un vivero de plantas de un año de edad que crecían en macetas, en condiciones de poca ventilación. El síntoma principal es una mancha de la hoja (0.4-0.8 cm de diámetro) con márgenes de color marrón (Luan y Su, 2008).

El hongo *Epicoccum sp.*, se caracterizó por tener esporodoquios oscuros, en forma de cojín, de tamaño variable, con conidióforos compactos, oscuros y cortos, el conidio era oscuro, unicelular (dictiosporo) y globoso (Barnet y Hunter, 1998), estas características también concuerdan con lo reportado por otros investigadores (William *et al.*, 1976). También se caracterizó por presentar un micelio color naranja (**Figura 2C, 2F**).

Desde 2005, los productores de la región de Canadá (British Columbia) reportaron disminución en la producción de arándano por muerte de estas plantas. Los síntomas comenzaron a aparecer en primavera cuando las plantas de arándano empezaron a perder sus hojas inferiores, y las demás hojas comenzaron a cambiar de coloración a rojo-marrón, los tallos tornaron a color gris claros y se observó la muerte del cultivo. Además de los agentes patógenos conocidos que infectan al arándano, se encontraron otros hongos como *Epicoccum spp.*, este hongo fue encontrado en hojas de arándano

en Nueva Jersey, en al menos 40 % de las hojas muestreadas durante un periodo de tres años (2006-2008).

Con base en la identificación de los hongos en el cultivo *in vitro* de arándano y a la revisión de literatura de la forma de propagación de estos organismos heterótrofos, fue posible controlar químicamente el crecimiento de estos en los explantes de arándano, por lo que fue necesario establecer las condiciones de asepsia en el área de trabajo, perfeccionar la técnica de siembra en la campana de flujo laminar y partir de planta madre libre de patógenos.

El hongo *Trichoderma sp.*, también fue aislado e identificado, sin embargo por encontrarse en una sola ocasión en el explante de hoja de arándano, no se incorpora a la lista de agentes contaminantes para este estudio, aunque cabe recalcar que cualquier microorganismo presente en la planta madre, es un contaminante para el cultivo *in vitro*.

Control de fitopatógenos presentes en el cultivo *in vitro* de arándano variedad Biloxi. Se detectaron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.0001$) para los diferentes tipos de fungicidas y la tasa de crecimiento de los tres hongos (Cuadros 2 al 4).

En relación al coeficiente de determinación (R^2) los valores de la tasa de crecimiento oscilaron entre 0.939 (*Alternaria sp.*), 0.958 (*Pestalotiosis sp.*), y 0.989 (*Epicoccum sp.*), lo que indica que los datos se ajustan al modelo utilizado para el análisis de la información. Por otra parte, al analizar los Coeficiente de Variación (CV) de la tasa de crecimiento de los tres distintos hongos con los cuatro diferentes fungicidas, muestran *Alternaria sp* fue el hongo que tuvo más variación en el crecimiento (21.10), por lo tanto,

mayor dispersión, en comparación con *Pestalotiopsis sp.* (15.36.), y el que menor variación en el crecimiento fue *Epicoccum sp.*(11.60), por lo tanto menor dispersión de los datos (Cuadro 2, 3 y 4).

Cuadro 2. Análisis de la varianza para el efecto de los fungicidas y para tasa de crecimiento de *Alternaria sp.*, determinado en el cultivo *in vitro* de arándano.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	19	118.813	6.253	65.30	<0.0001
Error	80	7.66	0.095		
Total corrección	99	126.47			
Días	3	37.95	12.65	132.12	<0.0001
Fungicida	4	68.42	17.10	178.64	<0.0001
Días*Fungicida	12	12.42	1.035	10.82	<0.0001
C.V= 21.10 R ² = 0.939					

Cuadro 3. Análisis de la varianza para el efecto de los fungicidas y para tasa de crecimiento de *Pestalotiopsis sp.*, determinado en el cultivo *in vitro* de arándano.

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	19	135.648	7.139	98.24	<0.0001
Error	80	5.814	0.0726		
Total corrección	99	141.426			
Días	3	53.668	17.889	246.16	<0.0001
Fungicida	4	69.269	17.317	238.28	<0.0001
Días*Fungicida	12	12.711	1.059	14.58	<0.0001
C.V= 15.36 R ² = 0.958					

Cuadro 4. Análisis de la varianza para el efecto de los fungicidas y para la tasa de crecimiento de *Epicoccum sp.*, determinado en el cultivo *in vitro* de arándano.

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	19	71.389	3.757	402.39	<0.0001
Error	80	0.747	0.009		
Total corrección	99	72.136			
Días	3	9.759	3.253	348.40	<0.0001
Fungicida	4	50.806	12.701	1360.28	<0.0001
Días*Fungicida	12	10.823	0.901	96.59	<0.0001
C.V= 11.60 R ² = 0.989					

Al hacer la comparación de medias (Tukey $p \leq 0.05$) de las variables en el *bioensayo in vitro* con diferentes fungicidas, los resultados indicaron la formación de cinco grupos en el efecto del fungicida sobre *Alternaria sp.*, cuatro grupos para *Pestalotiopsis sp.* y cinco grupos para *Epicoccum sp.*

El fungicida que logró la mayor inhibición del crecimiento del hongo *Alternaria sp.*, en comparación con el control (2.5 cm día^{-1}) fue la combinación de los ingredientes activos ciprodinil y fludioxonil (Fungicida 3), en el que sólo creció el hongo $0.290 \text{ cm día}^{-1}$, una respuesta similar sucedió con la inhibición del crecimiento para *Pestalotiopsis sp.* ($0.155 \text{ cm día}^{-1}$) y *Epicoccum sp.* ($0.150 \text{ cm día}^{-1}$) con este mismo fungicida (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tasas de crecimiento (cm día^{-1}) de *Alternaria sp.*, *Pestalotiopsis sp.* y *Epicoccum sp.*, en el bioensayo *in vitro* con diferentes fungicidas en un lapso de 28 días

No.	Fungicida	Tasa de crecimiento (cm día^{-1})		
		<i>Alternaria sp.</i>	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	<i>Epicoccum sp.</i>
5	Control	2.500 a	2.550 a	2.175 a
2	Carbendazim	2.135 b	2.165 b	0.895 b
1	Tiofanato metílico	1.640 c	2.065 bc	0.540 c
4	Mefenoxam+Mancozeb	0.765 d	1.840 c	0.405 d
3	Ciprodinil+Fludioxonil	0.290 e	0.155 d	0.150 e

La interacción de los ingrediente activos mefenoxam y mancozeb contenidos en el fungicida 4, fue el segundo mejor fungicida para el control de *Alternaria sp.*, *Pestalotiopsis sp.* y *Epicoccum sp.*; en el primer hongo, sólo creció $0.765 \text{ cm día}^{-1}$, en comparación con el control ($2.500 \text{ cm día}^{-1}$), el segundo hongo creció $1.840 \text{ cm día}^{-1}$, y el tercer hongo creció $0.405 \text{ cm día}^{-1}$.

El fungicida con el ingrediente activo tionafano metílico, ocupó el tercer lugar en la inhibición de los tres hongos; sin embargo, para el caso de *Pestalotiopsis*, no existieron diferencias significativas en la acción de inhibición en comparación con el fungicida carbendazim (Fungicida 2), que fue el peor fungicida para la inhibición del crecimiento de *Alternaria sp.* ($2.135 \text{ cm día}^{-1}$), y *Epicoccum sp.* ($0.895 \text{ cm día}^{-1}$), en comparación con el control (2.500 y $2.175 \text{ cm día}^{-1}$, respectivamente).

En la Figura 3, se observa el comportamiento del crecimiento micelial de los tres hongos en el bioensayo *in vitro* bajo la acción de los cuatro fungicidas seleccionados y un control para cada hongo. La inhibición del crecimiento de *Alternaria sp.*, por la mezcla fúngica de ciprodinil y fludioxonil, permaneció aún después de 28 días de establecido el bioensayo (Figura 3a).

Epicoccum sp., fue el hongo de más lento crecimiento (28 días), en comparación con *Alternaria sp.* y *Pestalotiopsis sp.*, que la cubrieron a los 21 días. Este mismo comportamiento se observa en el cultivo *in vitro* de arándano, ya que en los explantes sobrevivientes (10 % -20 %) a los 15 días, presentaban micelio anaranjado esponjoso a los 20 días de establecido el experimento, correspondiente al micelio de *Epicoccum sp.* (Figura 3).

Desde los primeros días de establecido el experimento, el fungicida ciprodinil y fludioxonil inhibió el crecimiento de *Pestalotiopsis sp.* en comparación con los otros fungicidas (Figura 3c).

A los siete días fue posible identificar la diferencia del efecto de los fungicidas en el crecimiento de *Pestalotiopsis sp.*; ciprodinil y fludioxonil (Fungicida 3) mantuvo control durante todo el experimento.

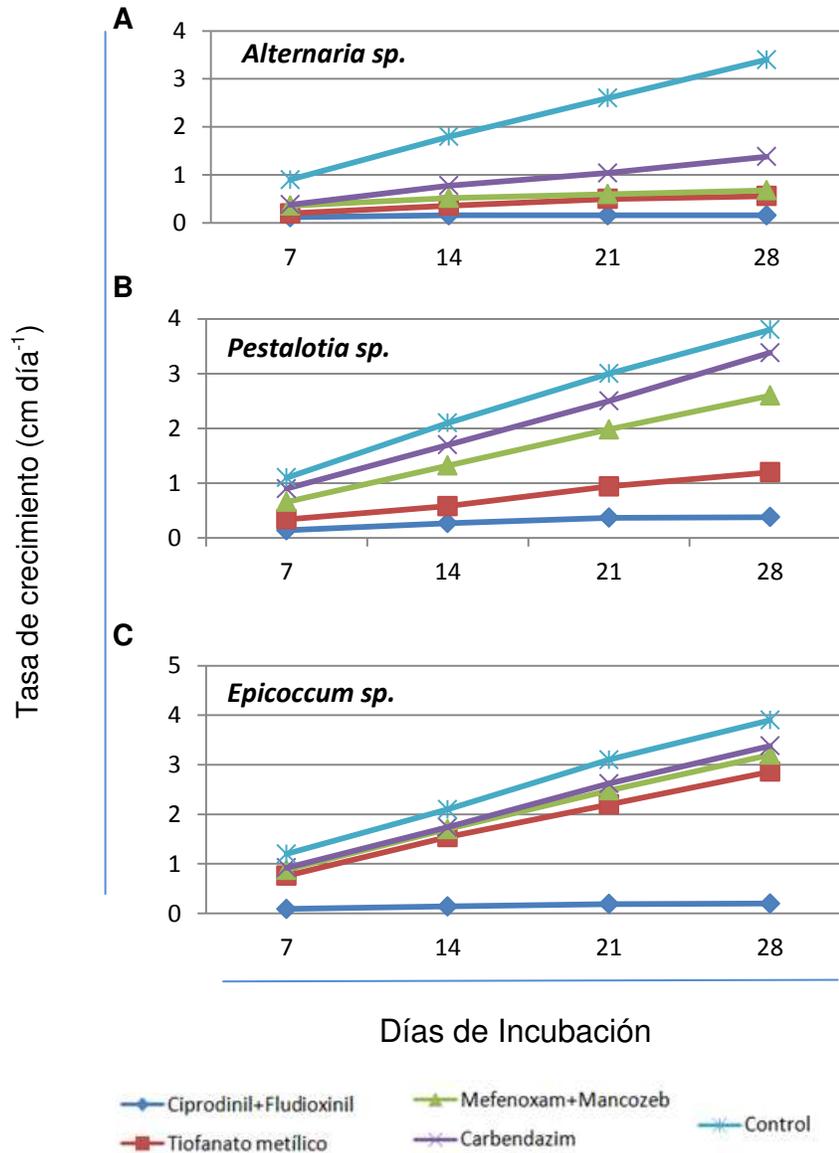


Figura 3. Efecto de los diferentes fungicidas sobre la tasa de crecimiento del micelio de los hongos fitopatógenos *Alternaria sp.* (A), *Pestalotiosis sp.* (B) y *Epicoccum sp.* (C) identificados en el cultivo *in vitro* de arándano a los 7, 14, 21 y 28 días en medio PDA a 27 °C.

En la Figura 4, se observa que ciprodinil y fludioxonil (Fungicida 4) es el que mostró mayor inhibición del crecimiento de micelio en los tres hongos aislados en el cultivo *in vitro* de arándano.

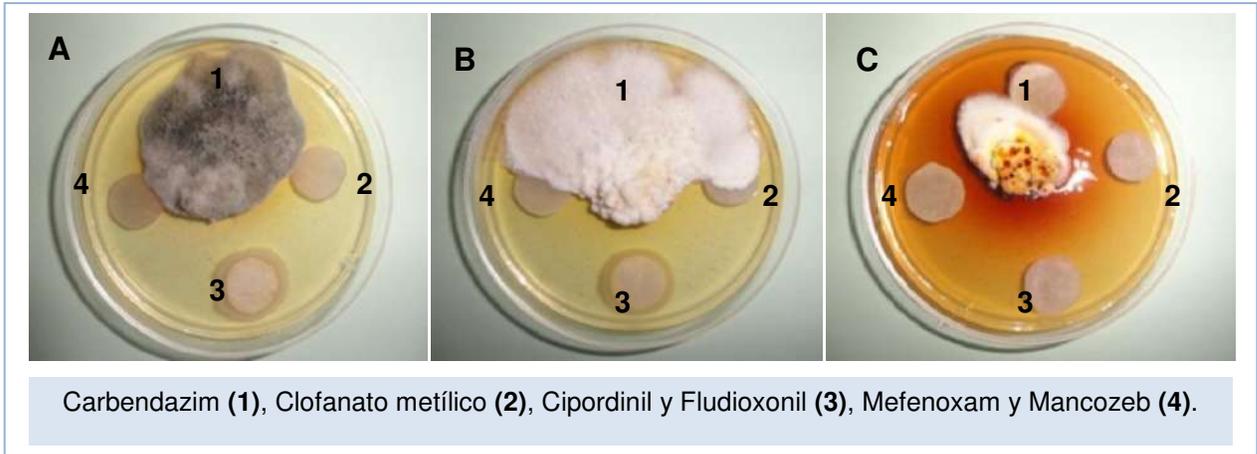


Figura 4. Fotografía del bioensayo para el control de *Alternaria sp.* (A), *Pestalotiopsis sp.* (B) y *Epicoccum sp.* (C), en arándano bajo condiciones *in vitro*.

Para *Epicoccum sp.*, no existen reportes del tratamiento con que ciprodinil y fludioxonil (Fungicida 4) o alguno de sus componentes, por lo que el aporte de este trabajo a la utilización de nuevos fungicidas en el control químico de *Pestalotiopsis sp.* y *Epicoccum sp.*, en arándano son relevantes para la sanidad del cultivo en la región productora de arándano del estado de Michoacán.

Establecimiento del cultivo *in vitro* aséptico. El cultivo *in vitro* aséptico de arándano se logró con el control de los hongos fitopatógenos mediante la fumigación de las plantas con ciprodinil y fludioxonil (Fungicida 3) cada quince días aproximadamente, esto redujo la contaminación de un 100 % a un 5 % (Figura 5). Las tijeras de podar se lavaron con detergente en cada corte.

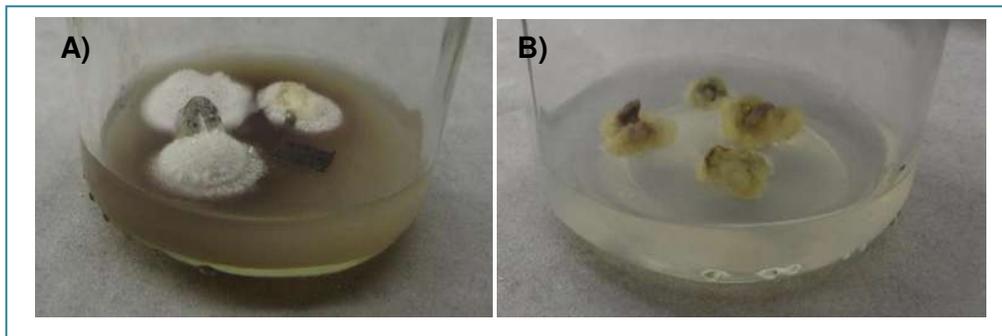


Figura 5. Fotografía de la contaminación de los explantes de hoja en el cultivo *in vitro* de arándano antes (A) y después (B) de la aplicación del fungicida ciprodinil y fludioxonil a las plantas donadoras de explantes.

CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones experimentales bajo las cuales se realizó el presente trabajo de investigación, se concluye lo siguiente:

Se identificó la presencia de *Alternaria sp.*, *Pestalotia sp.* y *Epicoccum sp.*, en plantas de arándano variedad Biloxi cultivadas en el invernadero y en explantes de arándano en el cultivo *in vitro*.

Los hongos fitopatógenos identificados en el cultivo de arándano variedad Biloxi, fueron controlados bajo condiciones *in vitro* con 1 mg L^{-1} de ciprodinil y fludioxinil.

Se establecieron las condiciones de asepsia en el cultivo *in vitro* de arándano variedad Biloxi.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios G N (1997)** Plant pathology. Academic Press, New York. 635 pp.
- Alcantar G G y L Trejo-Tellez (2009)** Nutrición de Cultivos. Biblioteca Básica de Agricultura. 454 pp.
- Andrews S (1992)** Differentiation of *Alternaria* species isolated from cereals on dichloran malt extract agar. En: Modern Methods in Food Mycology. Elsevier, Amsterdam. pp. 351-355.
- Barnett H L y B Hunter (1998)** Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4 Edition. Burgess Publishing Company, Minnesota, Minnesota. USA. 128, 152, 204 pp.
- Bautista-Baños S, M Hernandez-Lopez, E Bosquez-Molina, L Wilson (2003)** Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. Crop protection 22:1087-1092.
- De Cal A, SPascual (1994)** *In vitro* Studies on the effects of fungicides on beneficial fungi of peach twig mycoflora. Mycopathologia 126: 15-20.
- Espinosa V (2008)** Patógenos asociados a muerte regresiva de ramillas y canchris en arándano (*Vaccinium spp.*). Universidad Católica de Chile. Fac. de Agronomía e Ingeniería Forestal.
- Estopá B M (2005)** El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. Revista Electrónica. Extra 2005 viveros. España. 50-56.
- FAO (2008)** Estadística producción arándano. <http://www.fao.org/corp/statistics/es/>. Consultada 4 de Abril 2011.
- Kalt W and D Dufour (1997)** Health functionality of blueberries. Hortechology 7:216-221.
- Lacey J (1989)** Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored 86 Leonor Carrillo. Los hongos de los alimentos y forrajes. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement: 11S-25S.
- Luan Y, Z Shang, Y Su (2008)** Primer informe de *Pestalotiopsis* sp., en China. Causa de mancha de hoja de arándano. 92(1):171.
- McPhee W (1980)** Some Characteristics of *Alternaria alternata* Strains Resistant to Iprodione, *Plant Dis.* 64:847-849.
- Melo M (1998)** Evaluación de fungicidas [Mancozeb, Clorotalonil, Difenconazole, Cyprodinil] *in vitro* y a nivel de campo en el control de *Alternaria alternata* en tomate industrial. Universidad de Talca. Fac. de Ciencias Agrarias.

- Minoletti C (2000)** 3D Model of the F1 part of chloroplast ATP-synthase interacting with the phytotoxintoxin. Resumen 198, European Bioenergetics Conference. EBEC 2000
- Moss M (1991)** The environmental factors controlling mycotoxin formation. *In*: Smith JE, Henderson RS, editores. Mycotoxins and Animal Foods. CRC Press, Boca Ratón, Florida.p. 37-56.
- Muiño G B, J Almándo P y E Martín (2010)** Efecto *in vitro* del fungicida Iprodione sobre *Alternaria* spp. y prospección para su inclusión en estrategias de manejo en papa, tomate, ajo y cebolla. Fitosanidad. 14(3):171-176.
- Pieta D, E Patkowska, A Pastucha (2004)** The effect of biopreparations on the growth and development of certain fungi pathogenic towards papilionaceous plants. Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus 3(2):171-177.
- Pommer E, G Lorenz (1995)** Dicarboximide Fungicides. Modern Selective Fungicide. EE. UU. 2nd ed.
- Plucknett D I, J T Williams (1992)** Los bancos genéticos y la alimentación mundial. Instituto Iberoamericano de Cooperación para la Agricultura Tropical San José Costa Rica. Pp. 25-125.
- SAG Sociedad Argentina de Genética (2011)** Ministerio de Agricultura, Chile. División de Protección Agrícola y Forestal. <http://www.sag.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCryptedData=GP1TkTXdhRJAS2Wp3v88hGds1HKBCCTikqbEUrBdDus%3D&argModo=&argOrigen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivold=40500>(Última revisión 31 Julio 2012).
- SAGARPA (2010)** INFOGRAMAS. http://www.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/260810_Berrys_Def3.pdf (Última revisión 17 Enero 2012).
- SAS (2004)** Institute Inc., SAS/STAT. User's Guide, versión 9.0. Carey, N.C.
- Scherm H, A Savelle, P Brannen, and G Krewer (2007)** Occurrence and prevalence of foliar diseases on blueberry in Georgia. Online. Plant Health Progress 10:1-3.
- Szmagara M (2007)** Biotic and biotechnical factors inhibiting the growth and development of *Toxospora myrtilli*(feltg.) Boerema. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities 10(4): 1-4
- Steyaert RL (1949)** Contribuciones al estudio de Pestalotia. Genes de Pestalotiopsis. Jard. Bot. Bruxelles 19:285–354.
- Steyaert RL (1953a)** New and old species of Pestalotiopsis. Trans BrMycol Soc 36:81–89.
- Steyaert RL (1953b)** Pestalotiopsis from the Gold Coast andTogoland. Trans Br Mycol Soc 36:235–242.

- Steyaert RL (1961)** Type specimens of Spegazzini's collections in the Pestalotiopsis and related genera (Fungi Imperfecti: Melanconiales). Darwinia (Buenos Aires) 12:157–190
- Syngenta (2007)** Soluciones Syngenta Primera Edición 2. Syngenta Agro, S.A. de C.V.
- Uribe M E, C Delaveau, M Garcés, R Escobar (2008)** Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento in vitro de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. Bosque 29 (1): 58-64.
- Verma N, L MacDonald, Z K Punja (2006)** Inoculum prevalence, host infection and biological control of *Colletotrichum acutatum*: causal agent of blueberry anthracnose in British Columbia. Plant Pathology 55: 442–450
- William R, W Burge, L Buckley, J Sullivan, C Mc Grattan (1976)** Isolation and Biological Activity of the Pigments of the Mold *Epicoccumnigrum*, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 24(3):555-559.
- Wright E, A Cotta (1996)** Atizonamiento del arándano (*Vaccinium corymbosum*) ocasionado por *Fusarium* spp. En: Actas del VIII Congreso Latinoamericano de Horticultura. Montevideo, Uruguay. Pág. 124
- Wright E, M Rivera, A Rodríguez, A Cheheid, P Grijalba (1998)** Enfermedades del arándano (*Vaccinium spp.*) en los alrededores de Buenos Aires, República Argentina. Fitopatología 33(1):55.
- Wright E, M Rivera, J Esperón, A Cheheid, A. Rodríguez (2004)** *Alternaria* leaf spot, twig blight and fruit rot of highbush blueberry in Argentina. Plant Disease 88:1383.
- Wojdyla A T, L B Orlikowski, A Niekraszewicz, H Struszczyk (1997)** Chitosan in the control of *Sphaerotheca pannosa var. rosae* and *Peronospora sparsa* on roses and *Myrothecium roridum* on diffenbachia. VII Conf. Sec. for Biol. Control of Plant Dis. of Polish Phytopat. Soc. Skierniewice, 151.
- You R, S Fitzpatrick, T Forge, S Sabaratnam (2008)** Cranberry dieback disorder: a new and emerging threat to cranberry production in British Columbia. Acta Horticulturae. 810 (1): 417-424.
- Younis M, M Rashid, M Waseem (2004)** Physiological Studies on Pestalotiapsys and its Chemical Control. International Journal of Agriculture & Biology. 6(6):1107-1109.
- Zhang Z H, L Liu, Y Wu (2006)** Technical System of Blueberry Micropropagation in China. Actahorticulturae 715: 421-426.

CAPÍTULO II

BALANCE DE FITORREGULADORES EN EL CULTIVO *in vitro* DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L.) VARIEDAD BILOXI

RESUMEN

El cultivo *in vitro* de arándano 'Biloxi' es una alternativa potencial para satisfacer la demanda de plantas que existe en Jalisco y Michoacán, principales Estados productores de esta frutilla en México. Las dos vías indicadas para la formación *in vitro* de planta de arándano fueron evaluadas en este trabajo; sin embargo, la baja regeneración de brotes adventicios producidos por la vía organogénica fue limitada; mediante embriogénesis somática, se logró la formación de callo proembriogénico a partir de explantes de hoja y yema en un medio de cultivo Woody Plant Medium Modificado (WPMM) con 2,4-D (0.2 mg L^{-1} y 0.5 mg L^{-1}) en combinación con kinetina, 2iP y BA, en tres concentraciones (0, 0.2 y 0.5 mg L^{-1}). A los 90 días se evaluaron las variables peso del callo (**PC**), diámetro del callo (**DC**), callo friable (**CF**). Se practicó un ANOVA en una sola vía. La comparación de medias se hizo mediante la prueba de Tukey ($p \geq 0.05$), con la ayuda del paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2004). Los resultados fueron significativos para PC, y CF en la utilización de 0.2 mg L^{-1} de 2,4-D y 0.2 mg L^{-1} Kinetina con explante de hoja. A 3°C se observó el mayor PC, DC CF y menor OC al utilizar de 0.2 mg L^{-1} de 2,4-D y 0.2 mg L^{-1} 2iP. Se concluyó que es posible la inducción de callo proembriogénico en arándano variedad Biloxi a partir de explantes de hoja en el medio WPMM adicionado con 0.5 mg L^{-1} de 2,4-D y con 0.5 mg L^{-1} de 2iP.

INTRODUCCIÓN

Entre los principales reguladores del crecimiento vegetal se encuentran las auxinas, estas promueven el crecimiento por aumento de la expansión celular. De acuerdo con la hipótesis de crecimiento por acidificación (Azcón-Bieto y Talón, 2008), las auxinas estimulan la actividad de H⁺-ATPasa del plasmalema y provocan el bombeo de protones hacia la pared celular. Esto causa una disminución del pH que provoca la activación de expansinas, las cuales rompen enlaces de hidrógeno, debilitan la pared y permiten el depósito de nuevos materiales, cuya síntesis y transporte también son activados por auxinas.

En los medios utilizados en el cultivo *in vitro*, también es común que se apliquen citocininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además, estos compuestos inducen la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical (Reed y Abdelnour-Esquivel, 1991).

En uno de los primeros informes (Reed y Abdelnour-Esquivel, 1991) para el cultivo *in vitro* vía organogénesis, de especies y cultivares de *Vaccinium* se obtuvo 78% de brotación en explantes sembrados en medio Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd y McCown, 1981) con 4 mg L⁻¹ de zeatina, incubados a 25 °C en luz; con 10 ó 15 mg L⁻¹ de isopentiladenina (2iP) sólo se registraron 20 y 14 % de explantes con brotes, respectivamente.

Se han hecho numerosos trabajos con el uso de zeatina, en la que se han estudiado en combinación con otras citocininas (Cao y Hammerschlag, 2000; Meiners *et al.*, 2007; Debnath, 2009), diferentes variedades (Cao y Hammerschlag, 2002; Yadong *et al.*, 2006; Zhidong *et al.*, 2006), medios de cultivo (Rowland y Ogden, 1992), diferentes tipos de explante (Ostrolucká *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2003; Pereira, 2006) y diferentes

condiciones fisiológicas de la planta en tiempos del año diferentes (Kaldmae *et al.*, 2006), sin embargo el alto costo de esta, hace necesario alternativas de propagación utilizando otros fitorreguladores, que permitan a un bajo costo cumplir con la demanda del cultivo en la región productora de arándano.

En contraste con las numerosas investigaciones que existen en otros países, en México no existe información relacionada con la propagación *in vitro* de variedades con bajos requerimientos de frío, por lo que es necesario desarrollar un protocolo de micropropagación para variedades adaptadas a las condiciones de Michoacán.

Otra de las vías indicadas para la producción masiva de plantas es la embriogénesis somática. Se han hecho varias investigaciones sobre este proceso en otras especies, como en el caso de investigaciones en cafeto en Cuba, donde se muestran la inducción y proliferación de callo embriogénico a partir de hojas de ramas ortotrópicas de la zona media y superior de cafeto; en la primera etapa de inducción utilizaron medio MS con 25 mg L⁻¹ cisteína- HCl, 4 mg L⁻¹ Tiamina-HCl, 100 mg L⁻¹ Myo-inositol, 30 g sacarosa adicionado con 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D y 2 mg L⁻¹ kinetina (kin); en la segunda etapa de proliferación de callo embriogénico utilizaron el mismo medio con diferentes hormonas, 0.1 mg L⁻¹ ANA y 0.5 mg L⁻¹ Kinetina. Evaluaron la consistencia del callo (friable a esponjoso) y calcularon el porcentaje de callo altamente embriogénico a los 40 días (González, 2003).

Otras investigaciones para la formación de embriones somáticos es partir de callos de *C. sinensis* cv. Jaffa; después de seis semanas de cultivo, obtuvieron 50 % de callos después de ocho semanas en Murashige y Skoog (MS) con 1.0 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y en combinación con 0.1 mg L⁻¹ de kinetina, además de disminuir la concentración de sales de amonio y nitrato en el medio MS (Rodríguez-De

La O y Villalobos-Pietrini, 2002). El estado de Yucatán en colaboración con Cuba, desarrollaron embriones somáticos en *Agave fourcroydes* Lem a los 60 días, al utilizar diferentes tipos de explante, concentraciones de 2,4-D y otra auxina experimental llamada Dicamba. Como resultado obtuvieron que el ápice en combinación con 1.12 mmol L⁻¹ de 2,4-D fue el mejor tratamiento para el primer establecimiento de embriogénesis somática en henequén (González *et al.*, 2002).

En eucalipto se ha inducido callo y embriones somáticos a partir de explantes de hoja con el medio de cultivo Gamborg B5 con diferentes concentraciones de 2,4-D y Thidiazuron (TDZ), posteriormente, transfirieron estos callos en otros medios evaluando diferentes concentraciones de nitratos, Kinetina, ácido indolacético (AIA) y ácido giberélico (GA₃); analizaron la diferenciación de las estructuras globulares o proembiones (Martínez *et al.*, 2004).

La temperatura es otro factor importante que afecta el crecimiento de tejidos *in vitro*, es el control de la temperatura de incubación, debido a que influye directamente sobre la regulación del metabolismo primario o secundario, dirigiendo entre otros, el desarrollo de los procesos fisiológicos (Plucknett y Williams, 1992).

Por lo anterior, al considerar la importancia del balance de fitorreguladores, la temperatura y el tipo de explante en el cultivo *in vitro* de especies vegetales tanto por organogénesis como por embriogénesis, se hace necesario determinar estos factores en arándano variedad Biloxi, para lograr su multiplicación masiva.

Por lo tanto, el objetivo general del presente estudio consiste en establecer el tipo y niveles de auxinas y citocininas, tipos de explantes y temperaturas necesarias para la inducción de brotes adventicios y embriones somáticos en el cultivo *in vitro* de arándano variedad Biloxi.

METODOLOGÍA

Localización del sitio experimental. El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en Uruapan, Michoacán.

Material Vegetal. Los segmentos de hoja y yema utilizados como explantes de arándano de la variedad Biloxi fueron extraídos de plantas cultivadas bajo condiciones de campo provenientes de Los Reyes, Michoacán y, posteriormente, mantenidas bajo condiciones de invernadero en macetas de plástico de 12 L de capacidad. El sustrato utilizado consistió de una mezcla de peat moss (musgo de Canadá *Sphagnum* sp.) y tierra de encino en una proporción de 1:3 respectivamente.

Limpieza y desinfección del explante. Los segmentos de hoja y yema, utilizados como explantes, fueron frotados manualmente con detergente y agua corriente evitando causar algún daño físico. Posteriormente, los explantes fueron tratados con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 20 % v/v, durante 20 minutos (6 % de I. A.). Las condiciones de desinfección indicadas fueron determinadas en experimentos preliminares.

La desinfección y oxidación de los explantes fue resuelta tratando las hojas y yemas con cuatro lavados con una solución de dH_2O adicionada con 25 mg L^{-1} de cisteína. El procedimiento de desinfección se llevó a cabo en una campana de flujo laminar (marca VECO serie F-5039, corriente eléctrica 127 V, H.P. 185 W, Amp. 5 V).

Inducción de Organogénesis *in vitro*. Se utilizaron explantes de hoja con yema previamente esterilizados, en el medio de cultivo MS modificado (Villegas, 1997) adicionado con tiamina-HCl (0.4 mg L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}), sacarosa (10 g L^{-1}) y agar (6 g L^{-1}).

En el medio de cultivo se aplicaron seis tratamientos resultantes de la combinación de dos concentraciones de 2iP (2 y 3 mg L^{-1}) y tres de kinetina (0, 0.5 y 1 mg L^{-1}) en un arreglo factorial (Cuadro 1). Los tratamientos se establecieron bajo un diseño completamente al azar con diez repeticiones, donde la unidad experimental fue un frasco con cuatro explantes.

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para determinar el efecto de la concentración de 6-(γ,γ -dimetilalilamino) purina (2iP) con kinetina para inducir formación de brotes adventicios de *Vaccinium corymbosum* L.

Tratamiento	2iP		kinetina	
	mg L^{-1}	μM	mg L^{-1}	μM
1	2	0.985	0	0
2	2	0.985	0.5	2.325
3	2	0.985	1	4.651
4	3	14.778	0	0
5	3	14.778	0.5	2.325
6	3	14.778	1	4.651

El material se subcultivó a los 30 días en el WPM con 2 mg L^{-1} de 2iP y 0.5 mg L^{-1} de kinetina, se eliminó el tejido oxidado y se observó el crecimiento de los brotes a los cuatro meses.

Inducción de embriogénesis somática. Para inducir la formación de callo se establecieron tres experimentos; en el primero se evaluó la combinación de diferentes concentraciones de 2,4-D (0.2 y 0.5 mg L^{-1}) y 2iP (0 , 0.2 y 0.5 mg L^{-1}) bajo el efecto de la temperatura (3 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$) en un arreglo factorial $2 \times 3 \times 2$ completamente al azar

(Cuadro 2). El segundo experimento consistió en la evaluación del efecto del explante (hoja y yema) al utilizar diferentes concentraciones de 2,4-D (0.2 y 0.5 mg L⁻¹) y 2iP (0, 0.2 y 0.5 mg L⁻¹) en un arreglo factorial 2 x 2 x 3 completamente al azar (Cuadro 3). En el tercer experimento se evaluó la combinación de 2,4-D (0.2 y 0.5 mg L⁻¹) con diferentes citocininas (2ip, kinetina y benciladenina) y concentraciones (0, 0.2 y 0.5 mg L⁻¹) en un arreglo factorial 2 x 3 x 3 completamente al azar (Cuadro 4).

En los tres experimentos, se utilizó el medio de cultivo Woody Plant Medium Modificado (WPPM) con tiamina 0.4 mg L⁻¹, myo-inositol 100 mg L⁻¹, cisteína 10 a 25 mg L⁻¹, azúcar 10 mg L⁻¹, agar 6 g L⁻¹, el pH se ajustó a 5.2 antes de esterilizar el medio de cultivo en autoclave a 125 kg cm⁻² durante 15 minutos. Todos los experimentos se repitieron diez veces, y la unidad experimental fue un frasco de cultivo con cuatro explantes.

Cuadro 2. Tratamientos utilizados para determinar el efecto de la concentración de 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-(y,y-dimetilalilamino) purina (2iP) bajo efecto de la temperatura para inducir la formación de callo embriogénico a partir de explantes de hoja en arándano 'Biloxi'.

Tratamiento	2,4-D		2iP		Temperatura (°C)
	(mg L ⁻¹)	(μM)	(mg L ⁻¹)	(μM)	
1	0.2	0.904	0	0	3
2	0.2	0.904	0	0	25
3	0.2	0.904	0.2	0.985	3
4	0.2	0.904	0.2	0.985	25
5	0.2	0.904	0.5	2.463	3
6	0.2	0.904	0.5	2.463	25
7	0.5	2.262	0	0	3
8	0.5	2.262	0	0	25
9	0.5	2.262	0.2	0.985	3
10	0.5	2.262	0.2	0.985	25
11	0.5	2.262	0.5	2.463	3
12	0.5	2.262	0.5	2.463	25

n=120

Cuadro 3. Tratamientos utilizados para determinar el efecto de la concentración 2,4-D y 2iP con dos tipos de explante para inducir la formación de callo embriogénico a partir de explantes de hoja en arándano variedad Biloxi.

Tratamiento	2,4-D		2iP		Explante
	(mg L ⁻¹)	(μM)	(mg L ⁻¹)	(μM)	
1	0.2	0.904	0	0	hoja
2	0.2	0.904	0	0	yema
3	0.2	0.904	0.2	0.985	hoja
4	0.2	0.904	0.2	0.985	yema
5	0.2	0.904	0.5	2.463	hoja
6	0.2	0.904	0.5	2.463	yema
7	0.5	2.262	0	0	hoja
8	0.5	2.262	0	0	yema
9	0.5	2.262	0.2	0.985	hoja
10	0.5	2.262	0.2	0.985	yema
11	0.5	2.262	0.5	2.463	hoja
12	0.5	2.262	0.5	2.463	yema

n=120

Cuadro 4. Tratamientos utilizados para determinar el efecto de la concentración de 2,4-D y 2iP bajo efecto de la temperatura para inducir la formación de callo embriogénico a partir de explantes de hoja en arándano variedad Biloxi.

Tratamiento	2,4-D		Citocinina	2iP	
	(mg L ⁻¹)	(μM)		(mg L ⁻¹)	(μM)
1	0.2	0.904	2iP	0	0
2	0.2	0.904	2iP	0.2	0.985
3	0.2	0.904	2iP	0.5	2.463
4	0.2	0.904	Kin	0	0
5	0.2	0.904	Kin	0.2	0.985
6	0.2	0.904	Kin	0.5	2.463
7	0.2	0.904	BA	0	0
8	0.2	0.904	BA	0.2	0.985
9	0.5	2.262	BA	0.5	2.463
10	0.5	2.262	2iP	0	0
11	0.5	2.262	2iP	0.2	0.985
12	0.5	2.262	2iP	0.5	2.463
13	0.5	2.262	Kin	0	0
14	0.5	2.262	Kin	0.2	0.985
15	0.5	2.262	Kin	0.5	2.463
16	0.5	2.262	BA	0	0
17	0.5	2.262	BA	0.2	0.985
18	0.5	2.262	BA	0.5	2.463

n=180

Para la siembra se hicieron cortes de los explantes previamente esterilizados, para obtener secciones de hojas (1 cm²) y yemas (4 mm). La nervadura central de las hojas fue removida y colocada con la cara adaxial en contacto con el medio de cultivo. Los tratamientos se mantuvieron en oscuridad durante 90 días hasta el momento de ser subcultivados. La inducción de embriones somáticos por efecto de la temperatura, tipo de explante y reguladores del crecimiento, se evaluaron con base en las variables peso fresco (PC), diámetro (DC), área (%) de oxidación (OC), área (%) friable (CF) y color (CC) del callo.

El peso fresco se calculó utilizando una balanza analítica, donde se pesó cada frasco de cultivo con los cuatro explantes antes y después de ser subcultivado.

El diámetro del callo se midió en base a los extremos más largos del callo, esta medición se hizo en la campana de flujo laminar utilizando una cinta milimétrica adherida a la mesa.

El área de necrosis y callo friable, se cálculo con base en el porcentaje del área de la superficie de la hoja donde se encontraba callo friable y callo necrótico, respectivamente, se delimitó en cuadrantes imaginarios y se asignaron números del 1 al 5 que representaron el 0 a 100 % de área friable y necrótica (1=0 %, 2= 25 %, 3= 50 %, 4= 75 % y 5=100 %). Estas características fueron evaluadas con la ayuda del microscopio estereoscópico (Carl Zeiss, modelo Stemi DV4), además de evaluar el lugar donde inició el crecimiento del callo en los distintos experimentos.

El color de callo se evaluó con base en las Cartas de Color de la Royal Horticultural Society, se utilizó el bloque de Color Gris, y se asignó un número a 28 tonalidades, de los cuales, se formaron cinco grupos de tonos, ordenados del más claro al más oscuro: crema (1=NN155, 2=155C, 3=155A, 4=159C, 5=196D), amarillo claro (6=160C,

7=161C, 8=162C, 9=160B, 10=161B, 11=162B, 12=160A, 13=161A, 14=162A), verde claro (15=195A, 16=196C), verde oscuro (17=199A, 18=N199), café claro (19=164C, 20=164B, 21=199C), café oscuro (22=165C, 23=165B, 24=199A, 25=165A, 26=166A).

Los datos de las variables peso fresco del callo, diámetro del callo, área de callo friable y área de callo necrótico, se sometieron a análisis de la varianza en una sola vía con el procedimiento PROC ANOVA y se efectuó la prueba de Tukey ($p \geq 0.05$) de comparación de medias entre tratamientos con el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2004).

Proliferación de callo pro-embriogénico. Se llevó a cabo mediante el cultivo de secciones de tallo con una hoja completa y una yema axilar en el medio de cultivo WPMM con 0.2 mg L^{-1} de 2,4-D y 0.1 mg L^{-1} de kinetina en oscuridad a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 días para la iniciación; para la proliferación de callo proembriogénico se subcultivó el callo formado en un medio de cultivo WPPM con 0.2 mg L^{-1} de 2,4-D pero con diferentes concentraciones de Kinetina (Cuadro 5). Los tratamientos se mantuvieron en oscuridad y a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la evaluación del experimento.

La formación de callo friable o compacto en los explantes de hoja y yema de arándano se observó mediante el microscopio con cámara integrada Leica Microsystem Framework (LAS EZ) Versión 1.6.0 2008. La proliferación de callo pre-embriogénico por efecto de la combinación de 2,4-D con tres diferentes citocininas, se evaluó con base en las variables peso, diámetro y friabilidad del callo embriogénico, bajo un diseño completamente al azar con diez repeticiones, donde la unidad experimental fue un frasco de cultivo con cuatro explantes.

El análisis de varianza de los datos obtenidos, se realizó en una vía mediante el procedimiento PROC ANOVA y se efectuó la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \geq 0.05$) entre tratamientos, para esto último, se utilizó el programa de cómputo estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2004). La variable color del callo se analizó por medio de estadística descriptiva.

Cuadro 5. Tratamientos utilizados para determinar el efecto de la concentración de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) con kinetina para la proliferación de callo embriogénico de *Vaccinium corymbosum* L.

Tratamiento	2,4-D		kinetina	
	(mg L ⁻¹)	(μM)	(mg L ⁻¹)	(μM)
1	0.2	0.904	0	0
2	0.2	0.904	0.5	2.325
3	0.2	0.904	1.0	4.651
4	0.2	0.904	2.0	9.302

n=24

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de brotes adventicios mediante organogénesis *in vitro* de arándano. En este experimento se observó que a los cuatro meses, de cada explante emergieron uno o dos brotes adventicios con una longitud de 0.2 a 5.3 cm (Figura 1). El número de hojas regeneradas osciló de 4 a 17. Debnath (2009) reporta resultados similares utilizando TDZ. Con 2.3 y 4.5 mg L⁻¹ obtuvieron 1.9 y 2.7 brotes respectivamente; la longitud de los mismos fue de 5 a 7 mm a las ocho semanas de cultivado, este efecto se atribuye a la alta concentración de TDZ del medio.

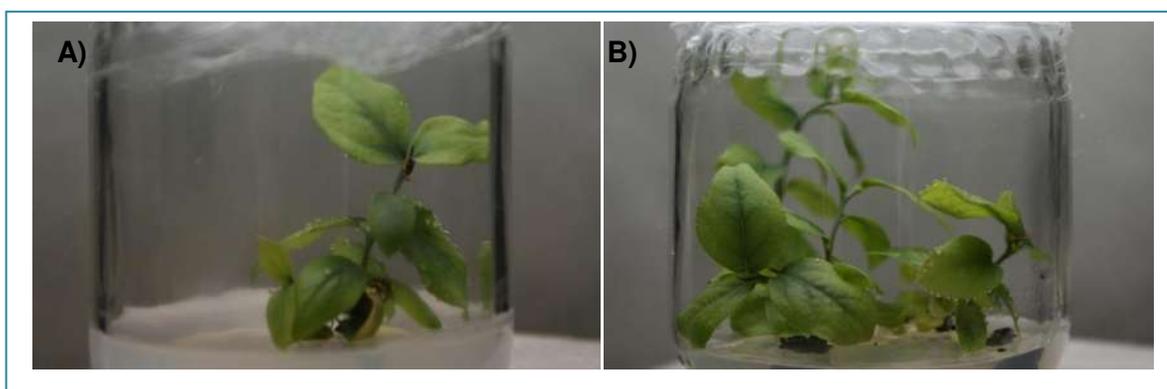


Figura 1. Fotografía que muestra un brote (A) y dos brotes (B) adventicios de explantes de hoja completa con yema en medio WPM con 2 mg L⁻¹ 2iP y 0.5 mg L⁻¹ de kinetina, cuatro meses después de subcultivos.

Efecto de la temperatura, de 2,4-D y 2iP, en la inducción de callo proembriogénico. Los resultados del análisis de varianza de la inducción de callo embriogénico bajo el efecto de la temperatura y de los fitorreguladores, se muestran en el **Cuadro 6**. Se observa que la temperatura influyó de manera altamente significativa en las variables peso fresco (PC), diámetro (DC), área (%) de oxidación (OC).

En lo referente al efecto del 2,4D, esta auxina indujo diferencias significativas en la variable DC, en contraste con el resto de las variables evaluadas. El PC también

presentó diferencias estadísticamente significativas en respuesta a los tratamientos de 2iP. En cuanto a las interacciones solo se determinó la existencia de un efecto diferencial cuando se evaluó el peso de callo en la interacción 2,4D*2iP*t. En el **Cuadro 7**, se presentan los resultados del análisis de varianza en una vía practicado para las variables área (%) friable (CF) y color (CC) del callo. Se observa que sólo la temperatura influyó de manera significativa en estas dos variables medidas en callo proembriogénico. Al analizar el efecto de la interacción **2iP*t** y las variables analizadas, únicamente se detectaron diferencias altamente significativas en **PC**.

Cuadro 6. Cuadrados medios para peso, diámetro y necrosis del callo, obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los fitorreguladores y la temperatura en la inducción de callo proembriogénico.

FV	GL	Peso Callo		Diámetro Callo		Área (%) oxidación callo	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F	CM	Pr>F
2,4-D	1	0.684	0.1027 ^{NS}	0.118	0.0264*	1.000	0.3371 ^{NS}
2iP	2	0.819	0.0433*	0.028	0.3014 ^{NS}	0.857	0.4532 ^{NS}
t	1	29.739	<0.0001**	7.192	<0.0001**	50.35	<0.0001**
2,4-D*2iP	2	0.438	0.1812 ^{NS}	0.039	0.1880 ^{NS}	3.178	0.0571 ^{NS}
2,4-D*t	1	0.473	0.1736 ^{NS}	0.017	0.3925 ^{NS}	4.085	0.0543 ^{NS}
2iP *t	2	0.384	0.2226 ^{NS}	0.025	0.3368 ^{NS}	2.590	0.0955 ^{NS}
2,4-D*2iP*t	2	1.765	0.0015**	0.032	0.2561 ^{NS}	1.564	0.2384 ^{NS}

NS: no significativa; (*) P≤0.05, (**) P≤0.01. T: Temperatura

Cuadro 7. Cuadrados medios para área (%) de callo friable y color del callo, obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los fitorreguladores y la temperatura en la inducción de callo proembriogénico.

FV	GL	Área (%) friable del callo		Color Callo	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F
2,4-D	1	0.003	0.8474 ^{NS}	0.790	0.5562 ^{NS}
2iP	2	0.277	0.0643 ^{NS}	5.503	0.0942 ^{NS}
t	1	4.176	<0.0001**	82.094	<0.0001**
2,4-D*2iP	2	0.137	0.2511 ^{NS}	7.058	0.0494 ^{NS*}
2,4-D*t	1	0.293	0.0866 ^{NS}	8.378	0.0578 ^{NS}
2iP*t	2	1.253	<0.0001**	4.542	0.1410 ^{NS}
2,4-D*2iP*t	2	0.187	0.1540 ^{NS}	2.210	0.3811 ^{NS}

NS: no significativa; (*) $P \leq 0.05$, (**) $P \leq 0.01$. t: temperatura

Las temperaturas bajas (del orden de 4-5 °C) permiten superar los periodos de dormancia de algunas leñosas y la conservación prolongada de determinados cultivos *in vitro*; mientras que una temperatura constante de 20 °C induce la formación de raíces en la mayoría de coníferas. Además, se ha Sin embargo, en esta investigación la acción de los fitorreguladores para la inducción de callo embriogénico, está enmascarada por los dos tratamientos de temperatura utilizados, por lo que se sugiere que en subsecuentes investigaciones se evalúen un mayor número de tratamientos de temperatura.

La temperatura no tiene algún efecto sobre la auxina 2,4-D por debajo de los 85 °C, que es su punto de fusión, su punto de ebullición es a los 134 °C, es soluble en a agua a 25 °C y se descompone totalmente a 1000 °C (CCE y IPCS, 1994); lo que corresponde con lo analizado estadísticamente en esta investigación. En el caso del efecto de la temperatura en 2iP, se reporta que 2iP es estable en el rango de -20 °C, ya que es la temperatura de almacenamiento, y 214 °C, donde es su punto de fusión y punto de descomposición (Sigma-Aldrich, 2012).

Reportes de diferentes investigaciones resaltan la importancia de emplear relaciones auxina/citocinina para lograr procesos morfogénicos (Vasic *et al.*, 2001), como la regulación de la división celular (Azcon-Bieto y Talón, 2008), por lo que la interacción entre 2,4-D y 2iP es necesaria para la formación de callo.

La interacción de 2,4-D, 2iP y temperatura no ha sido reportada en el cultivo *in vitro* de arándano; sin embargo, al analizar la acción de la temperatura y de estas dos hormonas por separado no se observó ningún efecto sobre las variables analizadas.

En la Figura 2, se muestran dos tipos de callos a partir de explante de hoja, el primero se mantuvo a 3 °C y el segundo permaneció a 25 °C, los dos permanecieron a esas temperaturas hasta su evaluación.

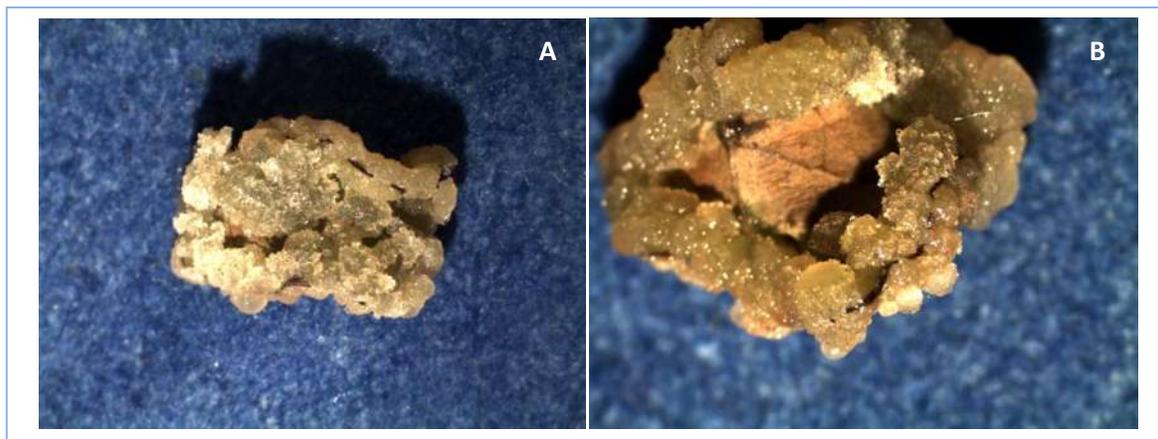


Figura 2. Fotografías que muestran los callos a partir de explantes de hoja bajo 3°C (A) y 25°C (B) en la inducción de callo proembriogénico de arándano variedad Biloxi.

Al efectuar la comparación de medias (Tukey al $p \leq 0.05$), de la interacción de 2,4-D*2iP*T sobre PC, los resultados indicaron que el mayor peso (3.1 g), se obtuvo al agregar 0.2 mg L⁻¹ de 2,4-D sin 2iP al medio de cultivo y con una temperatura 3°C. En contraste los pesos de callo con menores valores (1.2 g), fueron determinados en el tratamiento con 0.2 mg L⁻¹ de 2,4-D sin 2iP y a 25 °C. (**Figura 3**).

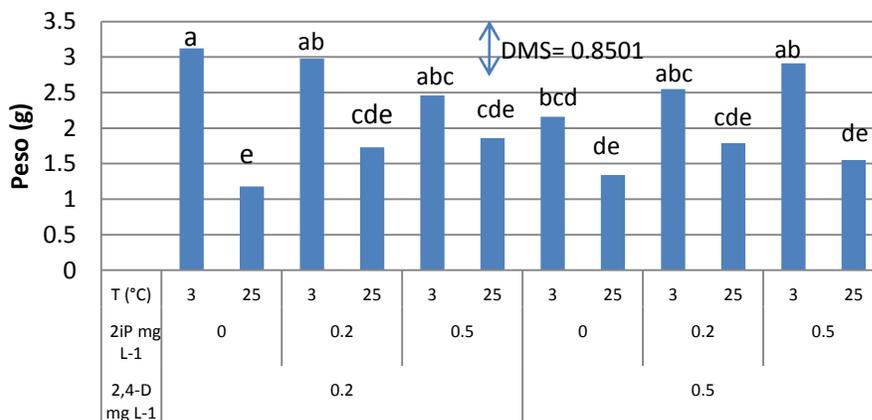


Figura 3. Efecto de 2,4-D, 2iP y la temperatura en el peso del callo a partir de explantes de hoja de arándano variedad Biloxi.

Aunque no existe relación entre 2iP y la temperatura, en la Figura 3 se observa que conforme va aumentando la concentración de esta citocinina en combinación con 0.2 mg L⁻¹ 2,4-D, a un temperatura de 3 °C, el peso del callo va disminuyendo, en contraste cuando se emplea una temperatura de 25 °C en las con las mismas concentraciones de estos fitorreguladores. Al analizar la respuesta del PC con relación al balance de auxinas/citocininas, se determinó que el PC disminuyó a medida que se incrementó la concentración de 2iP manteniendo la temperatura a 3C y la concentración de 0.2 mg L⁻¹ de 2,4-D. En contraste cuando se incremento a 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D manteniendo las condiciones de temperatura y concentraciones de 2iP, se observó una relación directa en el aumento del PC. Estos resultados son mostrados en la Figura 3.

Al hacer la comparación de medias (Tukey al $p \leq 0.05$) del efecto del 2,4-D en el DC, se determinó que el mayor diámetro (1.55 cm) se obtuvo al agregar 0.2 mg L⁻¹ de 2,4-D al medio de cultivo; y el menor diámetro se obtuvo al agregar 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D al medio de cultivo (**Figura 4**). Por lo que, el aumento de la concentración de esta auxina no implica mayor crecimiento del callo. Con relación a estos resultados, Hagen (1995) afirma que el 2,4-D detiene la división celular en el meristemo apical y la elongación celular cuando es aplicado en altas concentraciones, inhibiendo el normal crecimiento de las plántulas. De forma similar a estos resultados, en la presente investigación únicamente se indujeron callos en presencia de 2,4-D.

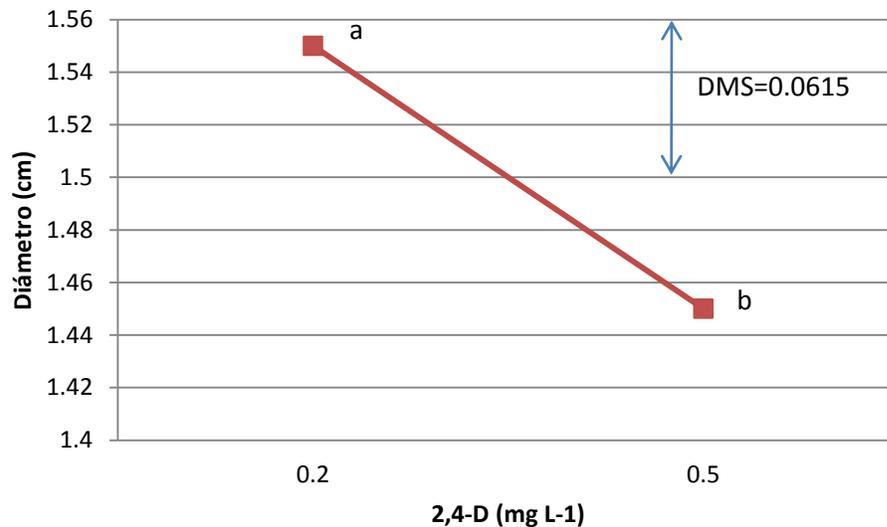


Figura 4. Efecto de 2,4-D en el diámetro del callo a partir de explantes de hoja de arándano variedad Biloxi.

En cuanto el efecto de la temperatura en el diámetro del callo en la **Figura 5**, se observa que a mayor temperatura (25 °C), el diámetro del callo es mayor (3.2 cm), en comparación con el callo que creció a 3 °C (1.15 cm). La reducción del crecimiento como producto de las bajas temperaturas, posiblemente se debe a la disminución de la actividad metabólica de las células, debido al descenso de la actividad enzimática (Bidwell, 1979), además de disminuir la temperatura se afectan algunos procesos como son: difusión de los gases y líquidos, viscosidad del agua e intercambio de iones (Westwood, 1978).

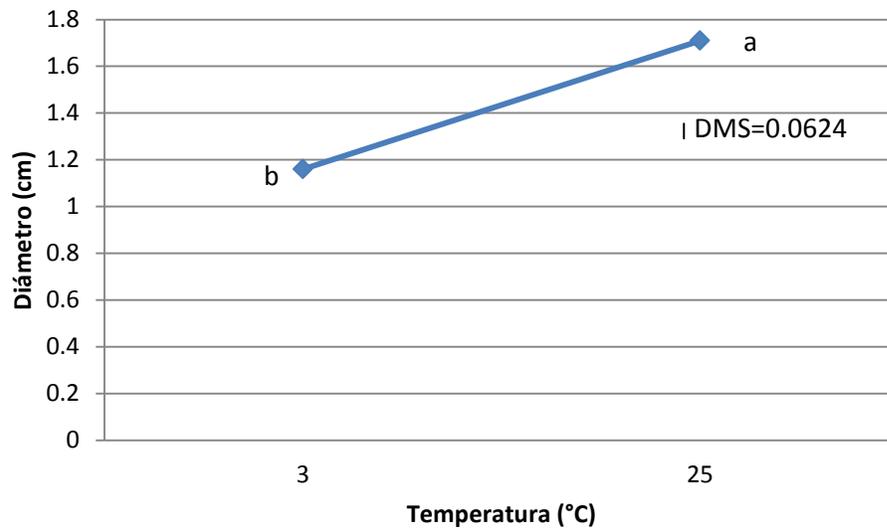


Figura 5. Efecto de la temperatura en el diámetro del callo a partir de explantes de hoja de arándano variedad Biloxi.

Por otra parte, la comparación de medias (Tukey al $p \leq 0.05$), para área de callo friable indicó que la mayor área (60 %) de callo friable, se obtuvo al adicionar al medio de cultivo 0.5 mg L^{-1} de 2iP a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Al disminuir la temperatura ($3 \text{ }^\circ\text{C}$) se observa que no hay diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de 2ip ($0, 0.2$ y 0.5 mg L^{-1}) (**Figura 6**).

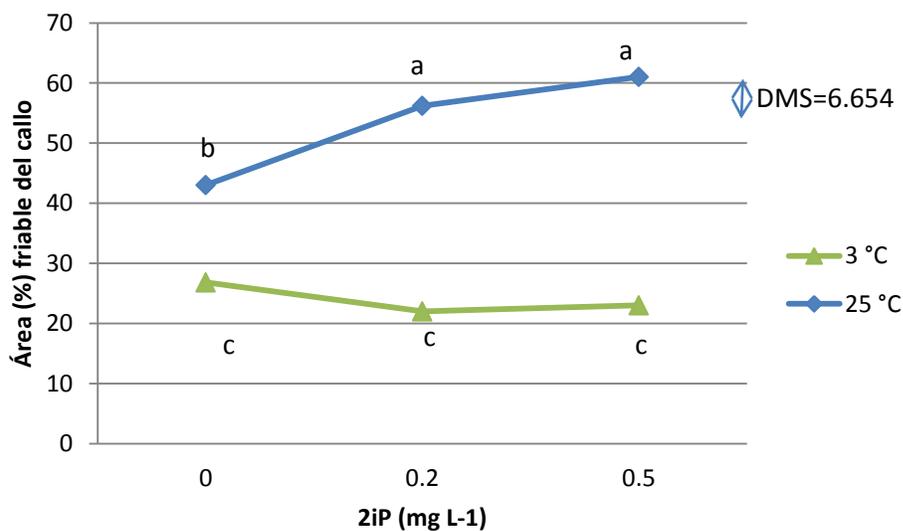


Figura 6. Efecto de 2iP en el área (%) friable del callo a partir de explantes de hoja de arándano variedad Biloxi.

La evaluación del área (%) de oxidación del callo indicó la presencia de una mayor área de necrosis (54 %) a 25 °C, en comparación del área de oxidación a 3 °C, que fue de 23 % (**Figura 7**), esto se debe probablemente a que la actividad de las enzimas encargadas en la biosíntesis y oxidación de los compuestos fenólicos disminuyen en condiciones de oscuridad y a bajas temperatura (George y Sherrington, 1993). Además, se ha descrito que la necrosis en el cultivo *in vitro* se ha relacionado con la presencia y disponibilidad de calcio en el medio de cultivo (Barghchi *et al.*, 1996), la transpiración de los brotes, aumentado el flujo de nutrientes hacia la parte superior del brote o bien evitando la acumulación en el frasco de gases y compuestos volátiles como el CO₂ o el etileno (De Proft *et al.*, 1985; Podwyszynska *et al.*, 1998), la frecuencia de subcultivos reduce la necrosis en los tejidos. Además de la adición de cisteína al medio de cultivo reduce la necrosis del explante y del callo formado.

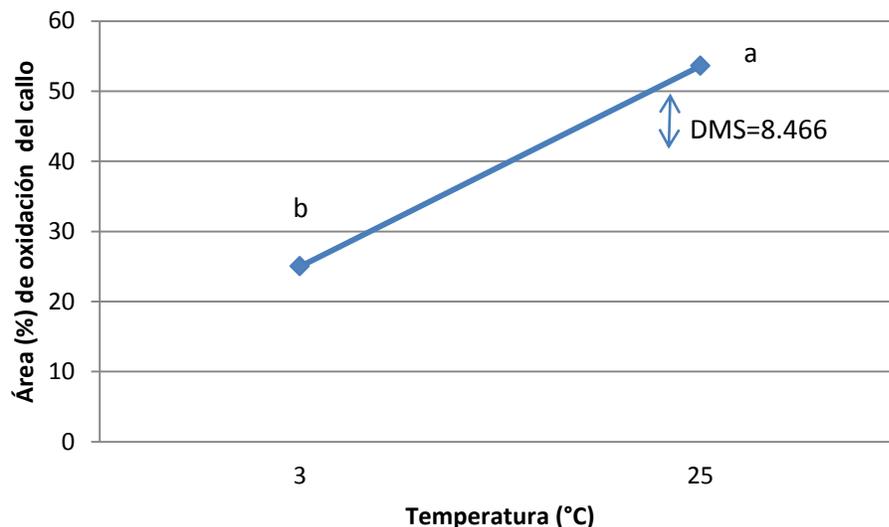


Figura 7. Efecto de la temperatura en el área (%) de oxidación del callo a partir de explantes de hoja de arándano variedad Biloxi.

Al efectuar la evaluación del color del callo, se observan dos tipos de colores, a principalmente a 3 °C, los callos presentan un color amarillo claro y a 25 °C, la tonalidad es verde claro. El la **Figura 8**, se observa estas coloraciones.

En otros estudios de la inducción de embriones somáticos en banano, se reportó la formación de callo después de seis meses de cultivo en el medio de inducción MS, los callos obtenidos fueron clasificados según su consistencia y color en: compactos blancos nodulares (CCBN), compactos blancos lisos (CCBL), marrones semi-compactos (CMSC) y beige friables (CBgF) (Jeanetvska *et al.*, 2006).

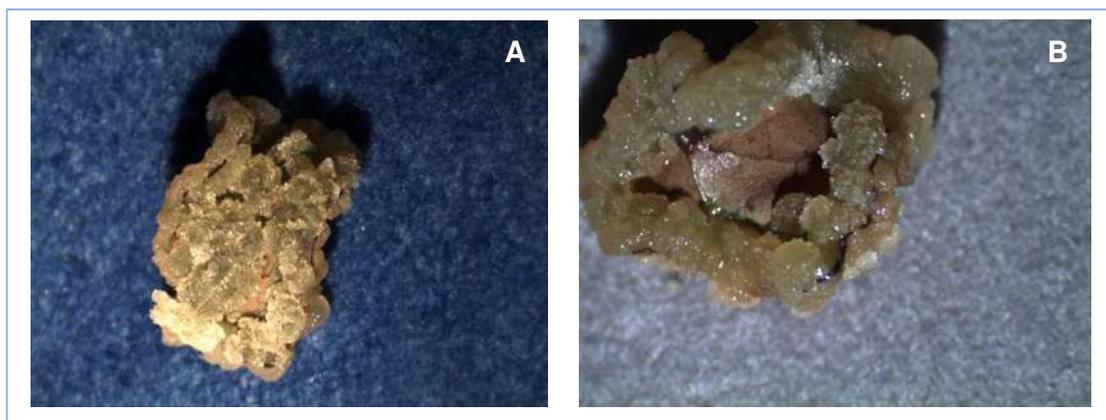


Figura 8. Fotografía que muestra la coloración amarillo claro del callo a 3°C (A) y coloración verde claro a 25 °C (B), en la inducción de callo embriogénico de arándano variedad Biloxi.

En este mismo sentido, Sánchez (2005), observó el cambio de coloración de los callos en papa cv. Fritolay-1867, donde se presentaron pequeños agregados celulares de consistencia compacta, algunos de forma globular y de coloración verde intenso; a la quinta semana estos se tornaron de un color verde claro brillante, en donde se empezó a la formar la etapa morfológica globular, a la sexta semana las estructuras

embrionarias cambiaron a una coloración verde amarillento, donde se observó la transformación del embrión de globular a oblonga.

Efecto de 2,4-D, 2iP y tipo de explante en la inducción de callo proembriogénico.

Los resultados del análisis de varianza para inducción de callo embriogénico bajo el efecto de tipo de explante y de los fitorreguladores, se muestran en el **Cuadro 8**. Se observa que el tipo de explante influyó de manera altamente significativa en las variables PC, DC y OC, lo mismo ocurre en la respuesta de los tratamientos al utilizar 2iP. En lo referente al efecto del 2,4D, esta auxina indujo diferencias significativas en la variable DC, en contraste con el resto de las variables evaluadas. En el mismo sentido, al analizar los resultados obtenidos de la interacción 2,4D*2iP*e, se observó un efecto diferencial en la respuesta de PC y DC. Resultados similares se presentaron en DC y OC en respuesta al efecto de la interacción 2iP*e.

En el **Cuadro 9**, se presentan los resultados del análisis de varianza en una vía practicado para las variables CF y CC. Se observa que el tipo de explante influyó de manera altamente significativa en estas dos variables. En lo referente a 2iP, esta citocinina también indujo diferencias altamente significativas en la variable CF. En el caso de las interacciones, se determinaron efectos diferenciales cuando se evaluó CF en la interacciones 2iP*e. Al analizar el efecto de la interacción 2,4-D*2iP*E se detectaron diferencias altamente significativas en CF y diferencias significativas en CC. Las auxinas como el 2,4-D, causan una rápida extensibilidad de pared en tallos jóvenes, su acción no es directa sobre la pared sino intracelular o en membranas plasmáticas. La célula vegetal exporta factores que aumentan la extensibilidad de la pared celular en respuesta a las auxinas (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Cuadro 8. Cuadrados medios para peso, diámetro y necrosis del callo, obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los fitorreguladores y tipo de explante en la inducción de callo proembriogénico.

FV	GL	Peso Callo		Diámetro Callo		Área (%) Oxidación Callo	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F	CM	Pr>F
2,4-D	1	0.684	0.3826 ^{NS}	0.118	0.0310*	1.000	0.0760 ^{NS}
2iP	2	0.819	<0.0001**	0.028	0.0007**	0.857	0.6150 ^{NS}
e	1	29.739	0.0067**	7.192	<0.0001**	50.35	<0.0001**
2,4-D*2iP	2	0.438	0.3155 ^{NS}	0.039	0.4155 ^{NS}	3.178	0.1353 ^{NS}
2,4-D*e	1	0.473	0.6064 ^{NS}	0.017	0.7431 ^{NS}	4.085	0.1201 ^{NS}
2iP*e	2	0.384	0.8743 ^{NS}	0.025	0.0278*	2.590	0.0131*
2,4-D*2iP*e	2	1.765	0.0005***	0.032	0.0010**	1.564	0.0979 ^{NS}

NS: no significativa; (*) P≤0.05, (**) P≤0.01, e: explante

Cuadro 9. Cuadrados medios para área (%) de callo friable y color del callo, obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los fitorreguladores y tipo de explante en la inducción de callo proembriogénico de arándano variedad Biloxi..

FV	GL	Área (%) friable del callo		Color Callo	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F
2,4-D	1	0.003	0.3580 ^{NS}	0.790	0.2216 ^{NS}
2iP	2	0.277	0.0044**	5.503	0.1185 ^{NS}
e	1	4.176	0.0020**	82.094	0.1406**
2,4-D*2iP	2	0.137	0.9555 ^{NS}	7.058	0.5961 ^{NS*}
2,4-D*e	1	0.293	0.3580 ^{NS}	8.378	0.0079**
2iP*e	2	1.253	0.0009**	4.542	0.0756 ^{NS}
2,4-D*2iP*e	2	0.187	0.0083**	2.210	0.0154*

NS: no significativa; (*) P≤0.05, (**) P≤0.01, e: explante

Para el cultivo *in vitro* de *Vaccinium* se han utilizado tipo de explantes como hoja (Cao y Hammerschlag, 2000; Debnath, 2009) y yemas axilares (Pereira, 2006).

En la **Figura 9** se muestran los callos producidos en explantes de hoja y yema, en el primero, el callo se formó en el contorno del explante, en el caso del callo que creció sobre yema, este cubrió la totalidad del explante desde las cuatro semanas de cultivo.

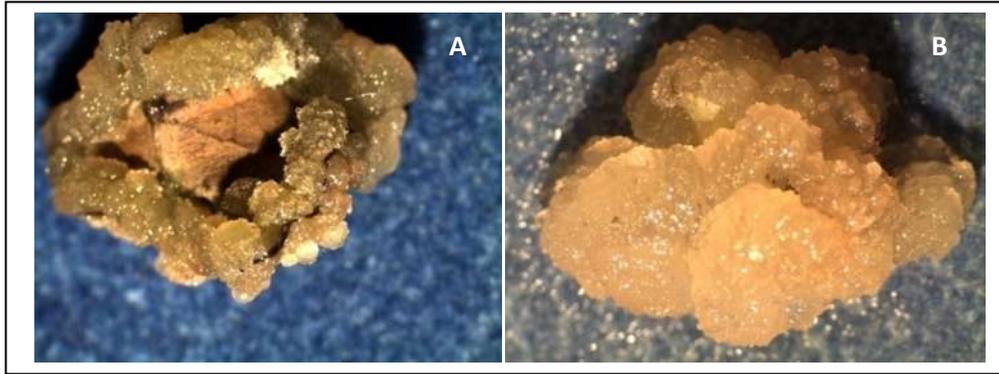


Figura 9. Fotografía que muestra los callos producidos en explantes de hoja (A) y yema (B) en la inducción de callo proembriogénico de arándano variedad Biloxi.

Al efectuar la comparación de medias (Tukey al $p \leq 0.05$) del efecto de la interacción de 2,4-D, 2iP y tipo de explante en PC, se observa que el mayor peso (2.25 g) se obtuvo al adicionar al medio de cultivo 0.5 mg L^{-1} de 2,4-D, 0.5 mg L^{-1} de 2iP en explante de yema. El menor peso (1.25 g) del callo se obtuvo al adicionar 0.2 mg L^{-1} de 2,4-D en explante de hoja sin adicionar 2iP al medio de cultivo. Los mayores pesos de callo se obtuvieron al utilizar yema como explante en comparación con la utilización de hoja (**Figura 10**).

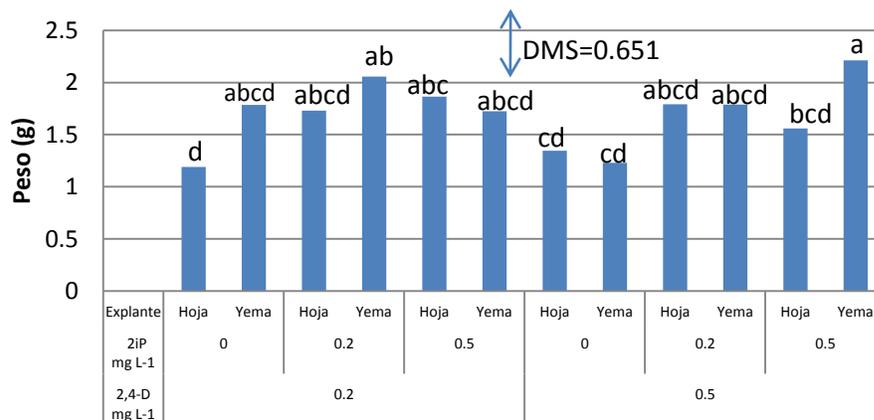


Figura 10. Efecto de 2,4-D, 2iP y tipo de explantes en el peso del callo a partir de explante de hoja de arándano variedad Biloxi.

Las células embriogénicas se desarrollan como embriones cuando las condiciones experimentales permiten que éstas expresen su potencial. Pueden ocurrir dos situaciones ontogénicas diferentes, es decir que su origen sea unicelular o pluricelular. En el caso de iniciarse a partir de una célula, ocurre que estas células embriogénicas se aíslan unas de otras por una importante modificación en su pared celular, en particular por la gelificación de la laminilla media. Esta célula, que está rodeada por un polisacárido mucilaginoso, sufre divisiones polarizadas formando un embrión globular, en donde pueden diferenciarse deposiciones de almidón en una etapa previa a la polarización de este proembrión, después de esto se forma la epidermis y adquiere la simetría bilateral. Sucesivamente, se observa el crecimiento de uno o más cotiledones, el desarrollo de los tejidos provasculares, la iniciación de los ápices radicales y de tallo y una progresiva acumulación de sustancias del tipo almidón, lípidos y proteínas. En el caso de que los embriones somáticos se originen de un grupo de células pueden observarse diversos patrones.

En cuanto al efecto de la interacción de 2,4-D, 2iP y tipo de explante en el diámetro del callo, se observó que al efectuar la comparación de medias (Tukey al $p \leq 0.05$), se observa que el mayor diámetro (1.9 cm) del callo, se obtuvo al agregar 0.2 mg L^{-1} de 2,4-D, 0.2 mg L^{-1} de 2iP en explante de hoja, y el menor diámetro (1.1 cm) del callo, se obtuvo al agregar 0.5 mg L^{-1} de 2,4-D, en explante de yema, sin agregar 2iP al medio de cultivo. Los mayores diámetros se obtuvieron al utilizar explantes de hoja en comparación con el explante de yema (**Figura 11**).

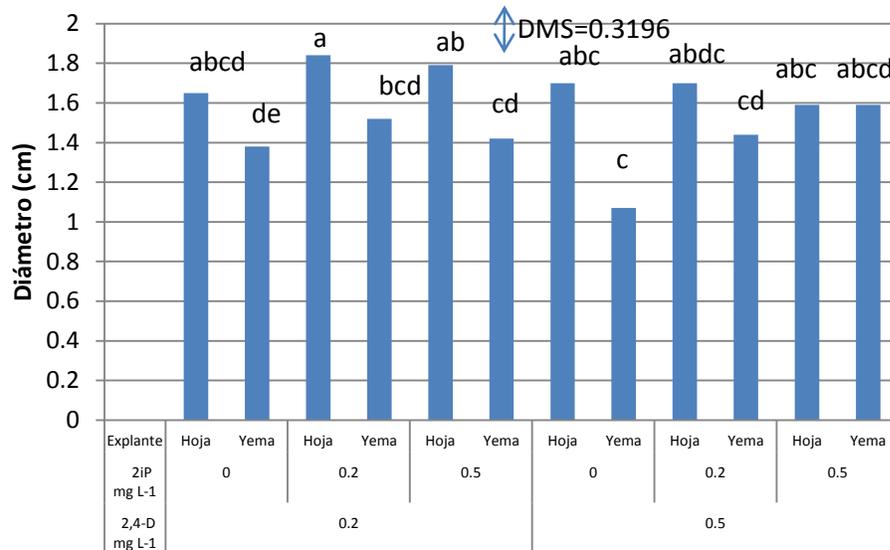


Figura 11. Efecto de 2,4-D, 2iP y tipo de explantes en el diámetro del callo, en la inducción de callo embriogénico de arándano variedad Biloxi.

Por otra parte la comparación de medias (Tukey al $p \leq 0.05$), para área de oxidación de callo, la interacción 2iP y tipo de explante, indicó que la mayor área (60 %) de oxidación se observa al utilizar 0.5 mg L^{-1} de 2iP en explante de hoja y la menor de área (20 %) en explante de yema (**Figura 12**).

Las citocininas inhiben la formación de radicales libres por lo que se evita la oxidación de ácidos grasos no saturados de membrana (Azcón-Bieto y Talón, 2008); sin embargo, en este experimento el efecto de oxidación del callo es probablemente generado por el tipo de explante utilizado.

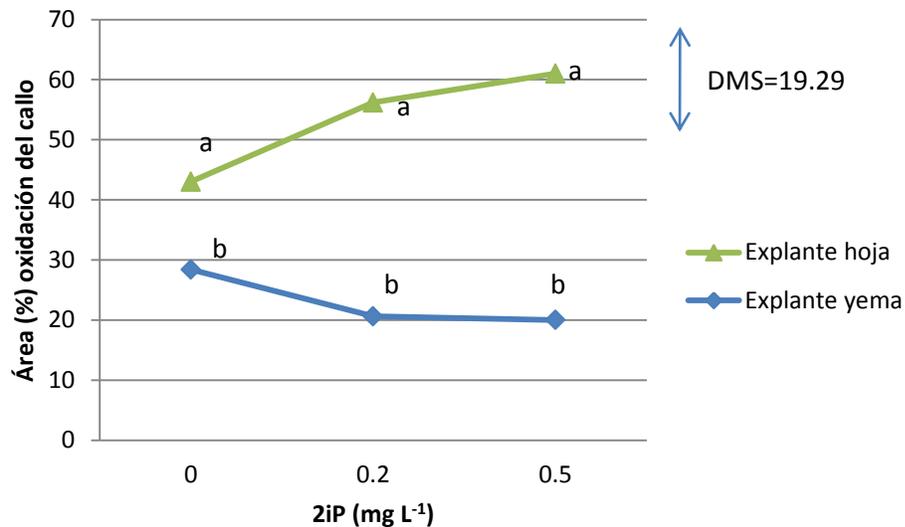


Figura 12. Efecto de 2iP y tipo de explantes en el área (%) de necrosis de callo en la inducción de callo embriogénico de arándano variedad Biloxi.

La evaluación del área (%) de callo friable indicó que la mayor área de callo friable (39%) se obtuvo al agregar 0.2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0.2 mg L⁻¹ de 2IP al utilizar explante de hoja. El menor (22 %) área de callo friable, se obtuvo al adicionar al medio de cultivo 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0.2 mg L⁻¹ de 2IP, en explante de yema. Las mayores áreas friables del callo se obtuvieron al utilizar explantes de hoja, en comparación con la utilización de yemas (**Figura 13**). Resultaron semejantes han sido reportados por Shibli y Smith (1996) en *Vaccinium pahlae* (Othelo) y *V. myrtillus*, ya que al analizar diferentes concentraciones de 2,4-D (0, 9.1 y 18.2 μM), lograron formar callo, pero no la regeneración de plantas. En otros experimentos en fresa (*Fragaria* sp.), Manosh *et al.*, (2007), evaluaron diferentes concentraciones de 2,4-D en combinación con ácido naftalenacético (ANA) y diferentes tipos de explante (hoja y sección intermodal de tallo), observaron que el mayor porcentaje de callo en el explante de hoja fue menor (79.1± 1.3 %) que al utilizar secciones de tallo internodal (79.7± 1.2 %), esto ocurrió al utilizar 4 mg L⁻¹ de 2,4-D.

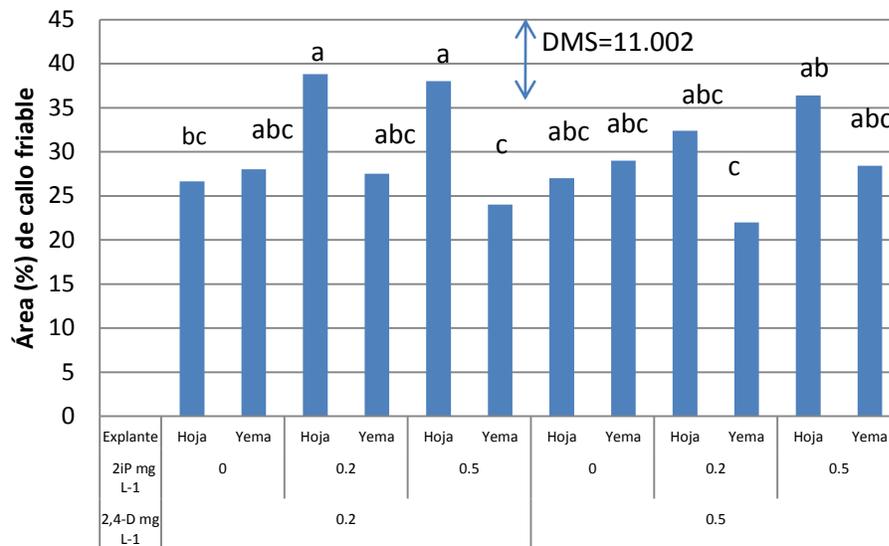


Figura 13. Efecto de 2,4-D, 2iP y tipo de explantes en el área (%) de callo friable en la inducción de callo embriogénico de arándano variedad Biloxi.

Para la producción de callo embriogénico en *Arabidopsis thaliana*, se reportan efectos similares a los resultados de esta investigación, además reportan la relación entre la expansión celular y el ciclo celular durante el embriogénesis somática (Raghavan, 2004), a esta auxina se le conjuga el gen reportero GUS, para visualizar la distribución de la auxina en los tejidos de desarrollo (Sabatini *et al.*, 1999), esto mostró que las células embriogénicas provenían de una sola célula, aunque también se observaron varios centros de múltiples células embriogénicas (Ewa *et al.*, 2007).

Al efectuar el análisis descriptivo del color del callo cuando se utiliza 2,4-D, 2iP y tipo de explante, se observa que sólo los tratamientos a los que se les aplico 0.2 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ de 2iP en explante de yema y 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D en explante de hoja sin explícitar 2iP al medio de cultivo, tuvieron una tonalidad amarillo. En los demás tratamientos se observó una coloración verde clara, verde oscura y café claro (**Figura 14**).



Figura 14. Fotografía que muestra las tonalidades de los callos en los explantes de hoja y tallo en la inducción de callo proembriogénico en arándano variedad Biloxi.

Efecto de 2,4-D en combinación con 2iP, Kinetina y BA en la inducción de callo proembriogénico. Los resultados del análisis de varianza de la inducción de callo embriogénico bajo el efecto de 2,4-D en combinación con diferentes citocininas, se muestran en el **Cuadro 10**.

Se puede apreciar que las variables PC, DC y OC mostraron una respuesta diferencial altamente significativa a la aplicación de diferentes tipos de citocininas probadas en este trabajo. En lo que respecta al efecto del 2,4-D, las variables DC y OC mostraron una respuesta diferente estadísticamente significativa. Finalmente el análisis del efecto de las interacciones de los tres factores estudiados, los resultados indicaron solo una respuesta estadísticamente significativa en la variable OC. En el **Cuadro 11**, se presentan los resultados del análisis de varianza en una vía practicado para las variables CF y CC. Se observa que la utilización del tipo de citocinina influyó de manera altamente significativa en estas dos variables medidas en callo proembriogénico; al

analizar el factor de concentración de citocininas ([Cit]), se observó un efecto altamente significativo en la variable CF. En lo referente a 2,4-D, esta auxina también indujo diferencias altamente significativas en la variable CC e indujo diferencias significativas en CF. En cuanto a las interacciones, se determinaron efectos diferenciales altamente significativos en la respuesta de CF en la interacciones 2,4-D*Cit y 2iP*[Cit]*Cit, mientras que en la interacción [Cit]*Cit, sólo se observaron diferencias significativas en CF.

El uso de la auxina sintética 2,4-D para la inducción de callo proembriogénico puede estar relacionado con la inducción de respuesta morfogénica (Vilchez *et al.*, 2002). Por lo general, se requiere la combinación de dos o más reguladores de crecimiento de diferentes clases, aplicados simultánea o secuencialmente, para obtener regeneración (Gaspar *et al.*, 1996).

Cuadro 10. Cuadrados medios para peso, diámetro y necrosis del callo, obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los fitorreguladores y tipo de explante en la inducción de callo proembriogénico.

FV	GL	Peso Callo		Diámetro Callo		Área (%) Oxidación Callo	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F	CM	Pr>F
2,4-D	1	0.684	0.4206 ^{NS}	0.118	0.0232*	1.000	0.0340*
¹ [Cit]	2	0.819	0.9906 ^{NS}	0.028	0.1558 ^{NS}	0.857	0.0106*
² Cit	1	29.739	<0.0001**	7.192	<0.0001**	50.35	<0.0001**
2,4-D*[]	2	0.438	0.1386 ^{NS}	0.039	0.0721 ^{NS}	3.178	0.3609 ^{NS}
2,4-D*Cit	1	0.473	0.6455 ^{NS}	0.017	0.2757 ^{NS}	4.085	0.1119 ^{NS}
¹ [Cit]* ² Cit	2	0.384	0.1119 ^{NS}	0.025	0.6828 ^{NS}	2.590	0.1747 ^{NS}
2,4-D* ¹ [Cit]* ² Cit	2	1.765	0.8764 ^{NS}	0.032	0.1327 ^{NS}	1.564	0.0182*

NS: no significativa; (*) P≤0.05, (**) P≤0.01, ¹[Cit]= concentración de citocininas. ²Cit =Tipo de citocinina (2iP, Kinetina, BA).

Cuadro 11. Cuadrados medios para área (%) de callo friable y color del callo, obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los fitorreguladores y tipo de explante en la inducción de callo proembriogénico.

FV	GL	Área (%) friable del callo		Color Callo	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F
2,4-D	1	0.003	0.0352*	0.790	0.0003**
¹ [Cit]	2	0.277	<0.0001**	5.503	0.0505 ^{NS}
² Cit	1	4.176	<0.0001**	82.094	<0.0001**
2,4-D* ¹ []	2	0.137	0.1636 ^{NS}	7.058	0.5322 ^{NS}
2,4-D* ² Cit	1	0.293	0.0001**	8.378	0.1754 ^{NS}
[]* ¹ Cit	2	1.253	0.0327*	4.542	0.2026 ^{NS}
2,4-D* ¹ [Cit]* ² Cit	2	0.187	0.0029**	2.210	0.2198 ^{NS}

NS: no significativa; (*) P≤0.05, (**) P≤0.01, ¹[Cit]= concentración de citocininas. ²Cit =Tipo de citocinina (2iP, Kinetina, BA)..

En trabajos realizados sobre la inducción de embriogénesis somática en el género *Swietenia*, se ha estudiado el efecto del 2,4-D (1.0 – 5.0 mg.l-1) combinado con la Kinetina (0.5 – 2.0 mg.L⁻¹), en diferentes tipos de explantes como discos de hoja, ápices y segmentos nodales de plantas de semillas germinadas *in vitro*. En contraste, en otras investigaciones (Maruyama e Ishii, 1999; Peña y Lezcano2001; Cruz da Rocha y Quoirin, 2004; Medina y Sotolongo, 2004), no se obtuvieron resultados alentadores en cuanto a la respuesta embriogénica. Resultados similares se observaron en la meliácea *Naregamiaalata*, en la cual no logró una respuesta embriogénica con la combinación de 2,4-D con Kinetina (Shaji *et al.* 1997). Sin embargo, en otros reportes se planteó que con el empleo de 2,4–D en combinación con kinetina (0.5 – 1.0 mg L⁻¹) en la inducción de embriogénesis somática en *Gossypium hirsutum*, se logró la embriogénesis somática directa y los mayores valores de embriogénesis somática de alta frecuencia se manifestaron en los tratamientos donde al medio de cultivo se le adicionaron concentraciones entre 3.0 – 5.0 mg mL⁻¹ de dicha auxina (Zhang, 2000).

En la Figura 15 se muestran los callos producidos en explante de hoja utilizando diferentes citocininas (2iP, Kinetina y BA), en combinación con 2,4-D.

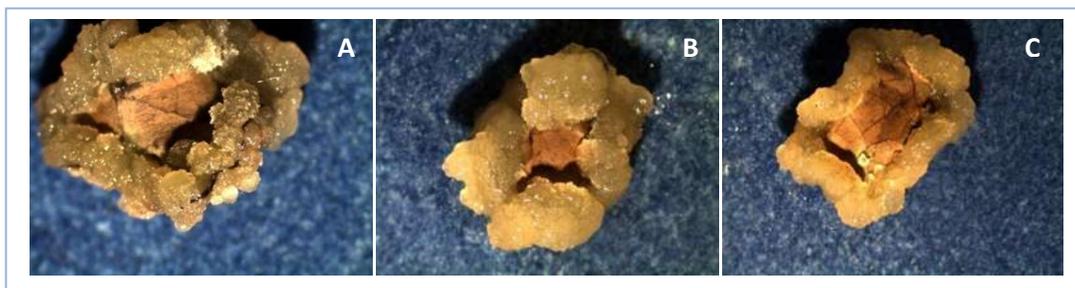


Figura 15. Fotografía que muestra los callos producidos en explantes de hoja por acción de las 2,4-D con 2iP (A), Kinetina (B) y BA (C), en la inducción de callo proembriogénico de arándano variedad Biloxi.

Al realizar la comparación de medias (Tukey al $p \leq 0.05$) del efecto de las citocininas 2iP, Kin y BA en PC, se observa que el mayor peso (2.45 g) se obtiene con la utilización de Kinetina, en comparación con las citocininas 2iP y BA que obtuvieron los menores pesos (1.5 g) (**Figura 16**). En experimentos similares sobre la inducción embriones somáticos pero de eucalipto, se obtuvo un peso de 2.5 g cuando se utilizó TDZ como citocinina en combinación con 1 mg L^{-1} de 2,4-D, similar a lo que se obtuvo en esta investigación, ellos no encontraron diferencias significativas en la interacción de los dos hormonas al evaluar esta variable. En otro trabajo (Wang y Bhalla, 2004) utilizaron algunas combinaciones de BAP (0.2; 0.5 y $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y de 2,4-D (0.1; 0.2; 0.5 y $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) para la inducción de embriogénesis somática en *Scaevola aemula* R. Br. Los embriones somáticos fueron inducidos en concentraciones bajas de 2,4-D y la concentración óptima de BAP en el medio para obtener una eficiente regeneración de tallos fue $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. El aumento de la concentración de BAP ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) no tuvo efecto sobre la regeneración de brotes. Adicionalmente, la alta concentración de 2,4-D (más de $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) tuvo efecto negativo, como la ausencia de callos. En el mismo sentido,

existen reportes (Guohua,1998; y Read y Preece, 2003) de que el BAP tiene un efecto positivo en la proliferación y alargamiento de tallos y yemas adventicias y que, por lo general, se presenta una mayor frecuencia de organogénesis cuando se incrementa su concentración. Sin embargo, cuando el incremento es muy alto, se presenta una inducción alta de callos y la frecuencia de organogénesis no aumenta.

Por otra parte, al hacer la comparación de medias (Tukey al $p \leq 0.05$) para el diámetro del callo con la utilización de 2,4-D, se observa que el menor diámetro (1.56 cm), se obtuvo a 0.5 mg L^{-1} de 2,4-D y el mayor diámetro (1.61 cm) a 0.2 mg L^{-1} 2,4-D (**Figura 17**).

En la **Figura 18**, se muestra el efecto de las diferentes citocininas en el diámetro del callo proembriogénico; se observa que el mayor diámetro (1.7 cm) se obtiene al utilizar 2iP, seguido por Kinetina con un diámetro de 1.57 cm, y por último BA (1.47 cm).

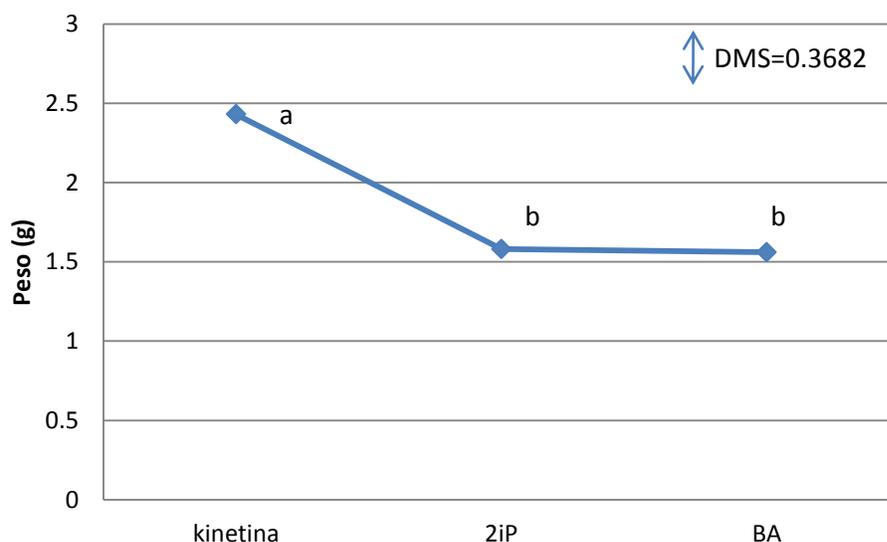


Figura 16. Efecto de las citocininas en el peso del callo, en la inducción del proceso embriogénico de arándano variedad Biloxi

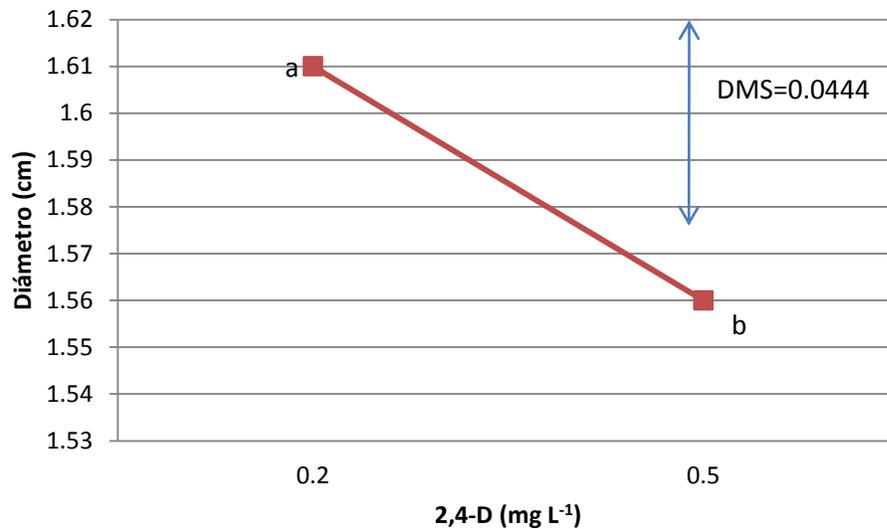


Figura 17. Efecto de 2,4-D en el diámetro del callo embriogénico de arándano variedad Biloxi.

Los embriones somáticos se forman a partir de grupos de células epidérmicas y subepidérmicas (George y Sherrington, 1993). Otros trabajos, reportan que en altas concentraciones de la auxina 2,4-D induce la formación de callo y suprime la producción de embriones (Kononowicks *et al.*, 1984). Sin embargo, en otro reporte se indujo la formación de callo en un medio MS suplementado con 2,4-D como principal elemento regulador, aunque adicionó una citocinina (2iP o BAP) para el desarrollo del callo (Omokolo *et al.*, 1997).

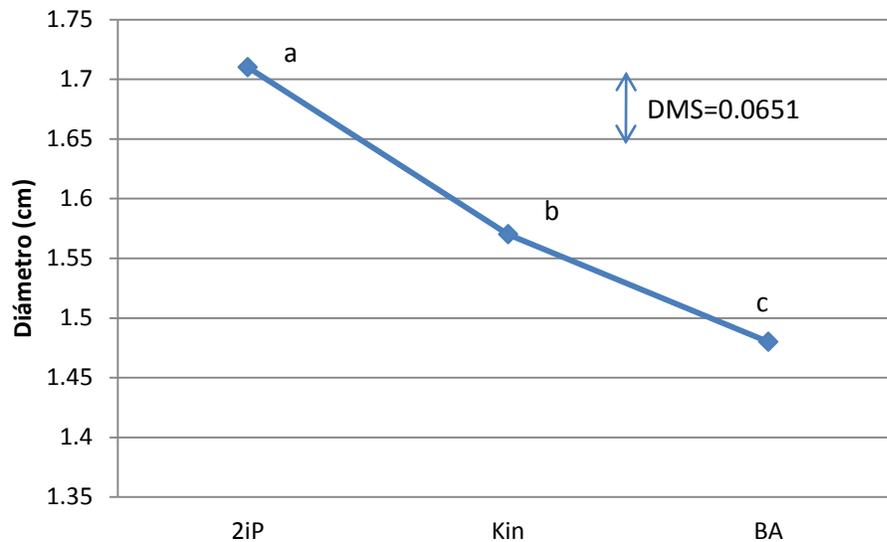


Figura 18. Efecto de diferentes citocininas en el diámetro del callo, en la inducción de callo embriogénico de arándano variedad Biloxi.

La evaluación de la variable área (%) de necrosis del callo indicó que la mayor área (75 %) de necrosis del callo, se obtiene al adicionar a medio de cultivo 0.2 mg L^{-1} de 2,4-D, en combinación con la citocinina 2iP a 0.5 mg L^{-1} . El menor (20 %) área de necrosis del callo, se obtuvo en al adicionar Kinetina en cualquiera de las concentraciones utilizadas (0 , 0.2 y 0.5 mg L^{-1}), en combinación con 2,4-D (0.2 y 0.5 mg L^{-1}) (**Figura 19**). Como se ha indicado, la citocinina 2iP, inhibe la formación de radicales libres por lo que se evita la oxidación de ácidos grasos no saturados de membrana (Azcon-Bieto y Talón, 2008), lo que no corresponde con lo determinado en este experimento. En otros estudios, al utilizar 2,4-D observaron que este se degrada más rápidamente en presencia de luz y a la octava semana de cultivo se observó un necrosamiento, lo cual disminuyó considerablemente el potencial embriogénico de los mismos (Vilchez *et al.*, 2002).

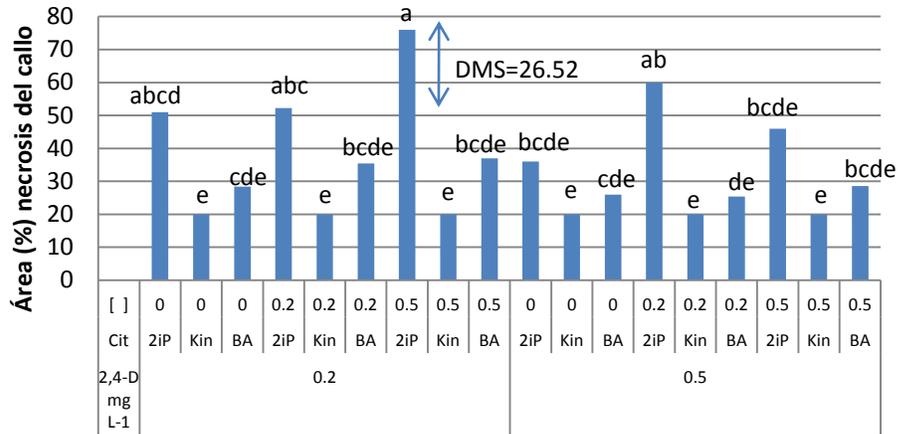


Figura 19. Efecto de 2,4-D y la combinación de diferentes citocininas y concentración, en el área (%) de necrosis del callo peso del callo, en la inducción del proceso embriogénico.

La evaluación de la variable área (%) de callo friable indicó que se obtiene un gran número de experimentos con 40 % de área de friable en el callo al utilizar diferentes concentraciones de kinetina (0.2 y 0.5 mg L⁻¹) en combinación con 2,4-D (0.2 y 0.5 mg L⁻¹), la menor área (23 %) de callo friable se observó al utilizar 0.2 mg L⁻¹ de 2,4-D con 0.2 mg L⁻¹ de 2iP (**Figura 20**). En otras investigaciones, se obtuvieron resultados similares al agregar al medio de cultivo 0.5 mg L⁻¹ de 2iP, ya que se obtuvo el 38 % área friable. En estudios sobre embriogénesis somática pero en anturio, se indujo callo con una combinación de 0.45 μM 2,4-D y 0.44 μM de BA (Kuehnle y Sugii, 1991). Otros autores en trabajos de este tipo en *A. scherzerianum*, lograron la formación de callos (61.4 %) con 5.75 μM 2,4-D combinado con kinetina en un híbrido y con 0.36 μM 2,4-D suplementado con 4.4 μM BA, en un medio de cultivo Nitsch y Nitsch modificado (Hamidah *et al.*, 1997).

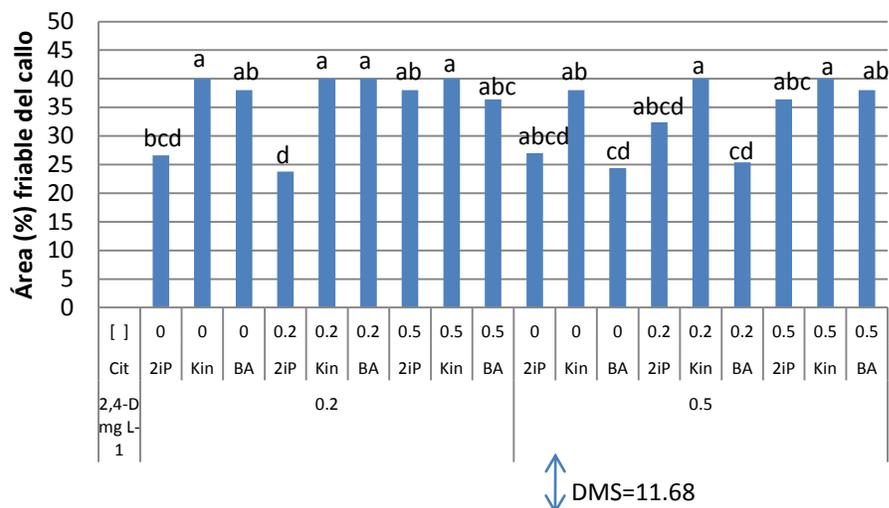


Figura 20. Efecto de 2,4-D y la combinación de diferentes citocininas (2iP, Kinetina, BA) y concentración, en el porcentaje área friable del callo peso del callo, en la inducción del proceso embriogénico.

Al evaluar el color del callo se observa que al utilizar 0.2 mg L^{-1} se obtiene un callo proembriogénico color verde claro, y al utilizar 0.5 mg L^{-1} de 2,4-D se observa un callo proembriogénico color amarillo. También se observa que las diferentes citocininas ejercen un efecto en el color del callo, ya que al adicionar BA se observa una coloración verde oscuro, al agregar 2iP al medio de cultivo, se observa tono de verde claro, el callo que se produce por la acción de Kinetina tiene una tonalidad amarilla clara (**Figura 21**). El color blanco del callo posiblemente se debe a la acumulación de almidón en las células, no se sabe si dicha acumulación resulta del desarrollo del callo que precede la formación de embriones y actúa como un desecante de la embriogénesis somática (Bhaskaran, 1990). Los tejidos que forman callo son sitios de intensa actividad metabólica, particularmente con respecto al metabolismo de carbohidratos (Okamoto *et al.*, 1980); los reguladores del crecimiento vegetal pueden actuar sobre estas células meristemáticas y alterar su metabolismo de carbohidratos y desarrollo de plastídios. En

algunos casos ocurre el desarrollo normal de cloroplastos y por consiguiente, de brotes que puede ser favorecido por las citocininas.

Adicionalmente, se evaluó la coloración y la friabilidad de los callos producidos en los subcultivos. En este sentido, el empleo de hoja completa con una yema, como explante produjo callos de color amarillo claro, friables y compactos por efecto de la interacción 0.2 mg L^{-1} de 2,4-D con 0.1 mg L^{-1} de kinetina cuando se subcultivó en el medio WPMM (**Figura 25**). El callo friable se formó con 2,4-D en ausencia de kinetina, comprobando que la utilización de 2,4-D puede producir embriones somáticos. El aumento en la concentración de 2iP produce un callo compacto (indiferenciado) necesario para la producción de arándano vía organogénesis.



Figura 21. Coloración del callo por efecto de diferentes citocininas (2iP, Kinetina, BA) en la inducción de callo embriogénico de arándano, variedad Biloxi.

La importancia de los subcultivos en la inducción de embriones somáticos se ha reportado (Grosser, 1992; Jiménez y Guevara, 1996) en *Carya illinoensis*, y se atribuye la baja formación de embriones somáticos con la reducción de carbohidratos de reserva por causa del cultivo prolongado. El tipo de células presentes en el explante determina el tipo de respuesta en la especie en estudio. Si el explante posee células embriogénicas basta solamente un estímulo para que las mismas se dividan para formar un embrión, originando lo que se conoce como embriogénesis somática directa.

Sin embargo, cuando el explante se trata de un tejido ya desarrollado en donde las células perdieron su carácter embriogénico, éstas pueden dividirse mitóticamente bajo condiciones que terminan induciendo un estado embriogénico, con lo que se genera un callo que adquiere capacidad embriogénica y, consecuentemente, la embriogénesis es indirecta (Parrot, 2002). Los dos tipos de explantes evaluados en este experimento (hoja y tallo con una yema), no evidenciaron embriogénesis directa; sin embargo, si se obtuvo desarrollo de tejido calloso sin la presencia de tejido embriogénico. En general, en las condiciones de fotoperíodo se obtuvieron más regenerantes que en condiciones de oscuridad. La intensidad lumínica, el fotoperíodo y la calidad de luz son factores potencialmente importantes en el ambiente del cultivo, porque pueden influenciar la fotosíntesis, la morfogénesis y otros procesos fisiológicos (Read y Preece, 2003). Las condiciones de luz de 12 a 16 h suelen ser lo mejor para el cultivo de muchas especies; ocasionalmente se ha reportado la relación fisiológica directa entre fotoperíodo y la respuesta del cultivo. La respuesta de los explantes a la condición de luz es muy variable y específica de algunas especies.

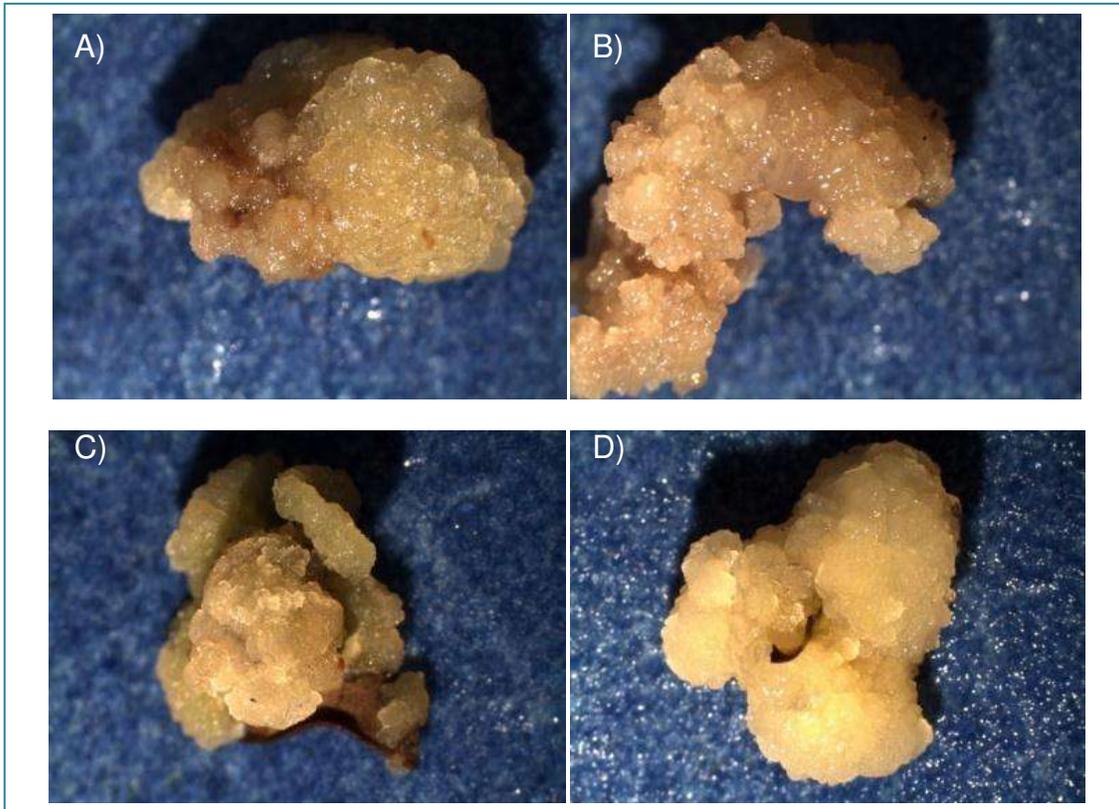


Figura 22. Callo proembriogénico de arándano variedad Biloxi, producido en explantes de hoja completa y yema. Interacción de 0.2 mg L^{-1} 2,4-D (**A**). Interacción de 0.2 mg L^{-1} 2,4-D con 0.5 mg L^{-1} kinetina (**B**). Interacción de 0.2 mg L^{-1} 2,4-D con 1.0 mg L^{-1} kinetina (**C**). Interacción de 0.2 mg L^{-1} 2,4-D con 2.0 mg L^{-1} kinetina (**D**).

CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones experimentales bajo las cuales se realizó el presente trabajo de investigación, se concluye lo siguiente:

La inducción de callo proembriogénico en arándano variedad Biloxi a partir de explantes de hoja a 3 °C, en el medio WPMM se logró adicionando 0.2 mg L⁻¹ de 2,4-D con 0.5 mg L⁻¹ de 2iP, en el que se logró el mejor peso del callo (PC) y diámetro del callo (DC) y la mayor área de callo friable (CF) y menor área de oxidación del callo.

El explante de hoja produjo el mayor DC y CF a 0.2 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.2 mg L⁻¹ de 2iP, mientras que el explante de yema produjo el mayor PC a 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ 2iP y menor OC a 0.2 mg L⁻¹ de 2,4-D.

La utilización de la citocinina Kinetina produjo mayor PC y CF, en comparación con 2iP y BA en la inducción de callo proembriogénico en arándano variedad Biloxi a partir de explantes de hoja en el medio WPMM.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja M R (1992)** Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers Dordrecht 520 p.
- Ammirato P V (1983)** Embryogenesis. *In*: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Y. Yamada. Handbook of Plant Cell Culture, Vol 1 (Eds.): (pp 82-123) Macmillan, New York.
- Arteaga P, C Batanero, J Ortíz, J Contreras (2011)** Sentido numérico y gráfico estadísticos. Publicaciones. 41, 33-49.
- Azcon -Bieto J, M Talón (2008)** Fundamentos de Fisiología Vegetal. Edit. Interamericana. Mc Graw-Hill. Madrid. 651 p.
- Bhaskaran S, R Smith (1990)** Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Sci.* 30: 1328-1336.
- Bidwell R G S (1979)** Fisiología Vegetal. Agt Editores. México p.784.
- Cao X, F Hammerschlag (2000)** Improved shoot Organogenesis from Leaf Explants of Highbush Blueberry. *Hortscience* 35(5):945-947.
- Cao X, F Hammerschlag (2002)** A Two-step Pretreatment significantly enhances Shoot Organogenesis from Leaf Explants of Highbush Blueberry cv. Bluecrop. *Hortscience* 37(5):819-821.
- Cao X, I Fordham, L Douglas, F A Hammerschlag (2003)** Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from *in vitro* propagated highbush blueberry shoots. *Plant cell tissue organ cult* 75:255-259.
- Cunha A, M Fernandez-Ferreira (1999)** Influence of médium parameters on somatic embryogenesis from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.). Effect of carbon source, total inorganic nitrogen and balance between ionic forms and interaction between calcium and zeatin. *Journal of Plant Physiology* 155:591-597.
- Cheema G S (1989)** Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. *Plant Cell Rep.*, 6: 348-351.
- Crozier A, Kamiya Y, Bishop G, Yokota T (2000)** Biosynthesis of hormones and elicitors molecules. *In*: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 850-929.
- Cruz da Rocha S, M Quoirin (2004)** Calogéneses e rizogéneses em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. *Ciencia Forestal* 14: 91-101.

- De Klerk G J, B Arnholdt-Schmitt, R Lieberei, K H Neumann (1997)** Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum* 39 (1): 53-66.
- Debnath S C (2009)** A two step procedure for adventitious shoot regeneration on excised leaves of lowbush blueberry. *In vitro cell.dev.biol.-Plant.* 45:122-128.
- Eastmond A, J Herrera L, M Robert L (2000)** La Biotecnología Aplicada al Henequén: Alternativas para el Futuro. Centro de Investigaciones Científica de Yucatán. México.p 17-25
- Ewa U, K Maigorzata, G Agnieszka, E Mazur (2007)** Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 226:619–628.
- Gaspar T, C Kevers, C Penel, H Greppin, D Reid, T Thorpe (1996)** Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant* 32:272-289.
- George E F, P D Sherrington (1993)** Plant Propagation by Tissue Culture Part 1. The technology. Butler and Tanner Ltd (ed). GranBretaña. 1361pp.
- Gómez R, I Herrera, M Freire, B Pérez, L García (1994)** Posibilidades del empleo de la embriogénesis somática a partir de callos como vía para la propagación *in vitro* de la caña de azúcar. *Centro Azúcar.* 4: 53-57
- González G O, S Alemán, F Barredo, M L. Robert (2002)** Embriogénesis somática en *Agave fourcroydes* Lem. *Biotecnología vegetal.* 2: 3-8.
- González M E (2003)** Estudio del proceso de callogénesis en genotipos promisorios de caféto (*Coffea canephora* P.). *Revista Colombiana de Biotecnología.* 1: 16-22.
- González, G, Trujillo R, Darías R, Peña E (1996-1997)** Micropropagación del henequén: Aportes a una tecnología. *Rev. Jardín Botánico Nacional.* 16 y 17:177-180
- Grosser J W (1992)** The role of biotechnology in the development of improved Citrus scion and rootsock cultivars. *In: Transaction of the 1992 Citrus Engineering Conference.* Florida Section of the American Society of Mechanical Engineers.38:24-37.
- Guohua M (1998)** Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54:1-7.
- Hagen G (1995)** The control of gene expression by auxin. *In: Davies, P. (ed.). Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.* Kluwer Academic Publishers, London. p. 228-245.
- Hamidah M, K Ghani-Abdul, P Debergh (1997)** Somatic embryogenesis and plant regenerarion in *Anthurium scherzerianum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48:189-193.

- ICSC (2012)** 0033 Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión de las Comunidades Europeas © CCE.
- IPCS (2012)** 1994. Fichas Internacionales de Seguridad Química. Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión de las Comunidades Europeas © CCE.
- Jaakola L A, K L Tolvanen, A Hohtola (2002)** Micropropagation of Bilberry and Lingonberry. *Acta Horticulturae* 574:401-403.
- Jeanetvska U G, R Valerio, T E Vargas, E García (2006)** Aspectos morfoanatómicos de callos originados durante el proceso de embriogénesis somática en banano Williams subgrupo Cavendish. *Agronomía Trop.* 56(4): 697-703.
- Jiménez V M, Guevara E (1996)** Regeneración *in vitro* mediante embriogénesis somática de variedades de cítricos II Efecto del "Plateo" de suspensiones celulares en medio de cultivo con diferentes carbohidratos sobre la inducción de embriones. *Agronomía Costarricense* 20(1): 9-16.
- Kaldmäe H, K Karp, T Paal (2006)** Effect of donor plant physiological condition on *in vitro* establishment of *Vaccinium angustifolium* shoot explants. *Acta Horticulturae* 715: 433-438.
- Kononowickz H, A Kononowickz, J Janick (1984)** Response of Embryogenic Callus of *Theobroma cacao* L. To Gibberellic Acid and Inhibitors of Gibberellic Acid Synthesis. *Pflanzenphysiologie*.113: 359-366.
- Kuehnle A R, N Sugii (1991)** Callos induction and plantlet regeneration in tissue culture of Hawaiian Anthurius. *HortSci* 26:919-921.
- Lloyd G, B McCown (1981)** Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kolmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings International Plant Propagator Society* 30: 421-427.
- Manosh K B and R Islam (2007)** Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus culture. *Monzur Hossain Plant Cell Tiss Organ Cult.* 90:49–54.
- Margaleff R (1977)** *Ecología*. Barcenola, España p. 951
- Martinez R R, R H Azpiroz, J L Rodríguez de la O, V M Cetina, M A Gutiérrez (2004).** Embriogénesis somática de *Eucalyptus Grandis* Hill Ex Maiden y *Eucalyptus Urophylla* S.T. Blake. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y ambiente.* 10 (002): 83-92.
- Maruyama E, Ishii K (1999)** Somatic Embryogenesis in Big- Leaf Mahogany (*Swietenia macrophylla* King). *Somatic embryogenesis in woody plants* 5: 45-63
- Medina M, R Sotolongo (2004)** Avances en el cultivo de tejidos de *Swietenia macrophylla* King. X *Swietenia mahogany* Jaco. *Revista Forestal Baracoa* (2) 23: 19-26

- Meiners J, Schwab M, Szankowski I (2007)** Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant cell Tiss Org Cult.*89:169-176.
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Okamoto K, H Kitano, T Akazawa (1980)** Byosintesis and excretion of hydrolases in germinating cereal seeds. *Plant and Cell Physiology* 21:201-204.
- Omokolo D, G Ndzomo, N Niemenak (1997)** Phenol Content, Acidic Peroxidase and IAA-oxidase During Somatic Embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Biologia Plantarum* 39(3): 337-347.
- Ostroluká M G, Libiaková G, Ondrusková E, Gajdosová E (2004)** *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis.* 676: 207-212.
- Parrot W (2002)** La embriogénesis somática en las angiospermas. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara.
- Peña E, G González B A, D Sosa, M Arteaga, D Rittoles, D Pérez, Z Torriente (1996)** Tecnología para la micropropagación del Henequén a gran escala. *Rev. Jardín Botánico Nacional.* 17-18: 169-176
- Peña J, J Lezcano (2001)** Cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King x *Swietenia mahogany* Jacq. Universidad de Pinar del Río Hermanos Saíz Montes de Oca, Pinar del Río.
- Pereira M J (2006)** Conservation of *Vaccinium cylindraceum* smith (ericaceae) by micropropagation using seedling nodal explants. *Society by in vitro biology.* 12: 65-68.
- Pierik R (1990)** Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Editorial Mundi Prensa. Madrid.218 pp.
- Plucknett D L y Williams J T (1992)** Los bancos genéticos y la alimentación mundial. Instituto Iberoamericano de Cooperación para la Agricultura Tropical San José Costa Rica. pp. 25-125.
- Raghavan V (2004)** Induction of vivipary in *Arabidopsis* by silique culture:implications for seed dormancy and germination. *American Journal of Botany* 89: 766–776.
- Read E, J Preece (2003)** Environmental management of optimizing micropropagation. *Acta Horticulturae* 616:49-57.
- Reed B M, A Abdelnour-Esquivel (1991)** The use of zeatina to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *Hortscience* 26(10):1320-1322.

- Rida A S and M A L Smith (1996)** Direct Shoot Regeneration from *Vaccinium pahalae* (Ohelo) and *V. myrtillus* (Bilberry) Leaf Explants. Hortscience 31(7):1225–1228. 1996.
- Robert M L, J L Herrera, F Contreras, N K Score (1987)** *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem (Henequén). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 8:37- 48.
- Robert M L, J L Herrera, J L Chan, F Contreras (1992)** Micropropagation of *Agave* spp. Biotechnology in Agriculture and Forestry 19:306-329.
- Rodríguez-De La O J L, R Villalobos-Pietrini (2002)** Coadyuvantes en el desarrollo *in vitro* de estructuras embriogénicas en callos de *citrus* . Revista Chapingo serie horticultura 8(2): 223-234.
- Rowland L J, E L Ogden (1992)** Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf sections of Highbush blueberry. HortScience 27:1127-1129.
- Sabatini S, D Beis, H Wolkenfelt, J Murfett, T Guilfoyle, J Malamy, P Benfey, O Leyser, N Bechtold, P Weisbeek, B Scheres(1999)** An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. Cell 99 463–472.
- Salisbury F, C Ross (2000)** Fisiología de las plantas. Thomson Edited Spain Paraninfo. Madrid. P 573-590.
- Sánchez E M C, J L Rodríguez de la O, G P Zárate de Lara, A López Herrera, S Barrales, G González (2005)** Embriogénesis Somática en papa cvs. Atlantic y Fritolay-1867. Revista Chapingo. Serie horticultura. 11 (002):219-224.
- Shaji J, E Soniya, K Valsala, G Nair (1997)** *In vitro* adventitious shoot formation from mature leaves and leaf derived calli of *Naregamia alata*. Indian Journal of Experimental Biology 35:1249-125.
- Shibli R A, Smith M A L (1996)** Direct shoot regeneration from *Vaccinium pahlae* (Othelo) and *V. myrtillus* (bilberry) leaf explants. HortScience 31:1225–1228
- Sigma-Aldrich (2012)** Regulatory Information <http://www.sigmaaldrich.com/safety-center.html> (Última revisión 17 de agosto 2012).
- Taíz L, Zeiger E (2006)** Plant Physiology. 4th ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachussets. USA. 764 p.
- Tapia R, R Castillo, N Nadina, M Blanco, J González, M Sánchez, Y Rodríguez, (1999)**Inducción, maduración y encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*SaccharumSp.*) Var Cp 5243.Biotecnología Aplicada 16(1):20 – 23.
- Tempé J, Schell J (1985)** La manipulación de las plantas. Mundo Científico 7(71):792-801.
- Vasic D, G Alibert, D Skoric (2001)** Protocols for efficient repetitive and secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* (Schrader). Plant Cell Reports 20, 121-125.

- Vilchez J A, N R Albany, R Gómez K (2002)** Inducción de embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. a partir de embriones cigóticos. Rev. Fac. Agron. 19: 284-293.
- Wang Y, P Bhalla (2004)** Somatic embryogenesis from leaf explants of Australian fan flower *Scaevola aemula* R. Br. Plant Cell Reports 22: 408-414.
- Westwood N M (1978)** Temperate-zone pomology. Ed. Freeman. EUU. p. 415.
- Yadong X, T Wulin, Z Zhang (2006)** Effect of organic material on soil properties, plant growth, leaf photosynthesis, nutrient uptake and mycorrhizal infection of blueberries. Acta Horticulturae 715: 375-380
- Yeoman M M (1970)** Early development in callus cultures. Int. Rev. Cytol. 29: 383-409
- Zhang B (2000)** Regulation of plant growth regulators on cotton somatic embryogenesis and plant regeneration. Biochemistry 39: 1567
- Zhidong Z H, Liu L, Wu Y L (2006)** Technical System of Blueberry Micropropagation in China. Acta horticulturae 715: 421-426.

CAPÍTULO III

REQUERIMIENTO DE NITRÓGENO Y RELACIÓN AMONIO: NITRATO EN EL CULTIVO *in vitro* DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L.) VARIEDAD BILOXI

RESUMEN

El objetivo del presente capítulo fue evaluar la inducción de embriones somáticos de arándano cv Biloxi en cultivo *in vitro*, en función de la concentración de nitrógeno total y de la relación nitrato: amonio incorporado al medio.

Se instalaron dos experimentos; en el primero se evaluó diferentes concentraciones de nitrógeno total (0, 15, 30, 60, 90 mg L⁻¹) de 2,4-D (0.5, 1.0 y 1.5 mg L⁻¹) y 2ip (0.2, 0.5, 0.8 mg L⁻¹); en el medio MS bajo un arreglo factorial 4 x 3 x 3. En el segundo experimento se evaluó la relación amonio: nitrato (0:3, 1:2, 2:1, y 3:0) con 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ 2ip en el medio MS en un arreglo factorial 4 x 2. En ambos experimentos los diseños experimentales fueron completamente al azar con diez repeticiones, donde la unidad experimental fue un frasco con cuatro explantes. Las variables de estudio fueron número de explantes con respuesta (RE), peso fresco (PC), diámetro (DC), área de oxidación de (OC) en por ciento, área de friabilidad (CF) en por ciento y color del callo (CC),

La evaluación de las variables peso, diámetro y oxidación del callo, concuerdan en que el mejor tratamiento es al que se le adiciona al medio de cultivo MS, 30 mM de nitrógeno total, sin hacer modificaciones en la relación amonio: nitrato (1:2) propuesta por Murashigue and Skoog en 1962.

INTRODUCCIÓN

En el cultivo *in vitro*, el contenido de nitrógeno total, la relación nitrato (NO_3^-): amonio (NH_4^+), así como el ión que acompaña al nitrógeno, tienen efectos en la respuesta de la inducción de embriones somáticos en los explantes (Wetherell&Dougall 1976, Mordhorst&Lörz 1993, Grimes&Hodges 1990).

El metabolismo y distribución de ambos iones, así como el reparto de sus productos en las plantas, son procesos que dependen de factores como luz, temperatura, especie y concentración nutricional, que pueden afectar o aún regular las reacciones de ciertos sistemas enzimáticos (Roubelakis-Angelakis y Kliwer, 1992).

Los mecanismos de absorción de NH_4^+ bajo condiciones *in vivo* e *in vitro* no están bien definidos, algunos autores indican que hay similitud entre la absorción de NH_4^+ y los iones monovalentes, especialmente K^+ , señalan, que es posible que los iones NH_4^+ y K^+ compartan un mismo sistema de absorción (Roubelakis-Angelakis y Kliwer, 1992).

Desde 1953 Heller, identificó algunos mecanismos fisiológicos en la planta que pueden explicar parcialmente los eventos que ocurren a nivel explante, el NH_4^+ promueve la penetración de aniones a expensas de los cationes, mientras que el NO_3^- permite el proceso inverso. Salisbury y Ross (1992) mencionan que la absorción de cationes, es favorecida por el gradiente de potencial eléctrico de la membrana plasmática (el electropotencial es negativo en el citosol). También señalan que la absorción de K^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} , se da con la ayuda de un portador o de un canal, y sólo la participación de una proteína de transporte puede explicar lo que se conoce acerca de la absorción de cationes. Para K^+ y NH_4^+ , la proporción de concentraciones medidas dentro y fuera de la célula indican los gradientes aproximados de concentración a

través de la membrana plasmática, ya que estos dos cationes monovalentes no están unidos con fuerza a algún anión.

El medio MS es rico en iones amonio, estos son más rápidamente asimilados que otras fuentes de nitrógeno, como el nitrato; en un medio con una concentración más baja de agar, esta absorción puede ser mayor, especulando que el incremento de la concentración de agar sirve para mejorar la absorción de nitrato a expensas de la concentración de amonio.

El efecto de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo sobre la inducción y proliferación de los embriones somáticos ha sido reportado en varios sistemas de cultivo *in vitro* (Fuentes-Cerda, 2001).

La asimilación del nitrógeno por las plantas requiere poder reductor, ATP y esqueletos carbonados. El poder reductor y el ATP pueden ser suministrados por las reacciones lumínicas de la fotosíntesis, o por la glucólisis y la respiración. Los esqueletos carbonados proporcionados por la oxidación de carbohidratos que, en último término, son formados por reducción fotosintética del carbono. La asimilación del nitrógeno es, por tanto, un proceso íntimamente conectado al metabolismo del carbono ya que el nitrato constituye una señal reguladora del metabolismo del nitrógeno y del metabolismo del carbono. El nitrato induce los genes requeridos para la absorción y reducción del nitrato, y la síntesis de esqueletos carbonados, como el 2-oxoglutarato, exigidos para la formación de aminoácidos. En cambio, el nitrato reprime los genes involucrados en la biosíntesis de carbohidratos (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

En el caso de la asimilación de nitrato en la planta, este consta de tres etapas: 1) absorción, 2) reducción del nitrato a amonio y 3) incorporación del amonio a esqueletos

carbonados para la síntesis de aminoácidos, proceso que recibe el nombre específico de asimilación del amonio.

En el medio de cultivo, la absorción de nitrato por el explante, disminuye a bajas temperaturas, anaerobiosis, y en la presencia de inhibidores metabólicos, lo que demuestra que es un transporte activo, esto es, dependiente de la energía metabólica. La absorción muestra una típica cinética de saturación de Michaelis-Mendel, lo que prueba que su transporte a través del plasmadema es facilitado por una permeasa o proteína transportadora.

Muchas especies vegetales muestran más de un sistema de transporte. Básicamente se han descrito dos: uno de alta afinidad y otro de baja afinidad. El sistema de transporte de alta afinidad (k_m para el nitrato entre 200 y 100 μM) se satura en concentraciones externas de nitrato inferiores a 1 mM y es inductible por el propio nitrato (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Cuando en el medio existe amonio, éste también puede ser absorbido, no obstante, al ser bastante tóxico, la mayoría de las plantas evita su acumulación incorporándolo rápidamente en los aminoácidos. Las vacuolas constituyen el principal sitio de almacenamiento del nitrato.

Tomando como base el análisis de los cambios transitorios que experimenta el potencial eléctrico del plasmalema al añadir nitrato a las células, y la dependencia de dichos cambios del pH externo, se ha propuesto que el nitrato es transportado al interior de la célula mediante un simporte con protones con una estequiometría de $2 \text{H}^+/\text{NO}_3^-$. El gradiente del potencial electroquímico de protones a través del plasmalema, necesario para sustentar el transporte de nitrato, es generado y mantenido por una H^+ -ATPasa que bombea protones hacia el exterior con la energía de hidrólisis del ATP.

El nitrato induce la síntesis de su propia proteína transportadora. Además, el transporte se encuentra regulado negativamente por la presencia de amonio o de otras formas reducidas de nitrógeno, como la glutamina. Una elevada concentración interna de nitrato también ejerce un control negativo sobre su propia absorción.

Se tienen documentadas investigaciones donde se han evaluados los requerimientos de nitrógeno en el cultivo *in vitro* en frutales, sin embargo, con especies leñosas resulta ser más compleja; debido a que, brotes de *Malu ssp.* (Zimmerman y Fordham, 1985; Welander, 1988), *Castanea mollissima* (Qiguanget *al.*, 1985), *Olea europea sativa* L. (Rugini, 1984), *Pyrus* *ssp.* (Singha *et al.*, 1987), *Prunu ssp.* (Pérez-Tornero y Burgus, 2000) y *Vitis* *ssp.* (Biasiet *al.*, 1998; Dzazioet *al.*, 2002) no han respondido satisfactoriamente al alto contenido de sales de los medios de cultivo comúnmente empleados. Entre los factores que determinan la respuesta, tanto en las diferencias en el metabolismo vegetal, como en los niveles endógenos de nutrimentos, se puede señalar a la especie y el tipo de explante (Cunha y Fernández-Ferreira, 1999).

En los tejidos no fotosintéticos, como los explantes del cultivo *in vitro*, el NADH requerido por la nitrato reductasa (NR), es producida por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en la mitocondria, y exportado al citosol mediante la enzima malato-oxalacetato. Por todo lo anterior, se plantea que es necesario evaluar los requerimientos de nitrógeno así como la relación nitrato: amonio en el medio de cultivo para la inducción de embriones somáticos de arándano variedad Biloxi.

El objetivo general del presente estudio consistió en evaluar la respuesta del nitrógeno y de la relación nitrato: amonio en el medio de cultivo para la inducción de embriones somáticos en el cultivo *in vitro* de arándano variedad Biloxi.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de diferentes concentraciones de nitrógeno, 2,4-D y 2ip Para la evaluación de la inducción de callo. El material vegetal utilizado fueron explantes de hojas de arándano cv Biloxi, fueron cortados y desinfectados con hipoclorito de sodio comercial al 20 % v/v, durante 20 minutos (6 % de I. A.). Las condiciones de desinfección indicadas fueron determinadas en experimentos preliminares.

El medio de cultivo fue el MS modificado en las concentraciones de nitrógeno (0, 15, 30, 60, 90 mg L⁻¹) de 2,4-D (0.5, 1.0 y 1.5 mg L⁻¹) y 2ip (0.2, 0.5, 0.8 mg L⁻¹). Con un diseño de tratamientos factorial 4 X 3 X 3 que da un total de 36 tratamientos (Cuadro 1). Las otras sales que conforman el medio MS no fueron modificadas (4 mg L⁻¹ de Tiamina, 100 mg L⁻¹ Myoinositol, 25 mg L⁻¹ Cisteína, 10 g L⁻¹ Azúcar.). Una vez colocado el medio en los frascos en estos se colocaron cuatro segmentos de callo con seis repeticiones de cada tratamiento, en un diseño experimental completamente al azar donde la unidad experimental fue un frasco de cultivo con cuatro explantes.

Los frascos se colocaron en obscuridad y a 25 °C hasta la evaluación del experimento. A los 15 días posterior a la siembra, se subcultivó en el medio antes mencionado, pero sin la adición de la auxina 2,4-D. A los 50 días después se evaluó: número de explantes con respuesta (RE), peso fresco (PC), diámetro (DC), área de oxidación en porcentaje (OC), área de friabilidad en porcentaje (CF) y color del callo (CC).

Cuadro 1. Tratamientos establecidos para medir el efecto de la concentración de nitrógeno total en la inducción de callo embriogénico en arandano cv. Biloxi.

Tratamiento	2,4-D (mg L ⁻¹)	2ip (mg L ⁻¹)	Nitrógeno (mM)
1	0.5	0.2	0
2			30
3			60
4			90
5		0.5	0
6			30
7			60
8			90
9		0.8	0
10			30
11			60
12			90
13	1.0	0.2	0
14			30
15			60
16			90
17		0.5	0
18			30
19			60
20			90
21		0.8	0
22			30
23			60
24			90
25	1.5	0.2	0
26			30
27			60
28			90
29		0.5	0
30			30
31			60
32			90
33		0.8	0
34			30
35			60
36			90

2,4-D= ácido 2,4-diclorofenoxiacético, N₂=Nitrógeno, n=360

El peso fresco se calculó utilizando una balanza analítica, donde se pesó cada frasco de cultivo con los cuatro explantes antes y después de ser subcultivados.

El diámetro del callo se midió en base a los extremos más largos del callo, esta medición se hizo en la campana de flujo laminar utilizando una cinta milimétrica adherida a la mesa.

El área de necrosis y callo friable, se cálculo con base al porcentaje del área de la superficie de la hoja donde se encontraba callo friable y callo necrótico, respectivamente, se delimitó en cuadrantes imaginarios y se asignaron números del 1 al 5 que representaron el 0 a 100 % de área friable y necrótica (1=0 %, 2= 25 %, 3= 50 %, 4= 75 % y 5=100 %). Estas características fueron evaluadas con la ayuda del microscopio estereoscópico (Carl Zeiss, modelo Stemi DV4).

El color de callo se evaluó con base en las Cartas de Colores de la Royal Horticultural Society, se utilizó el bloque de Color Gris, y se asignó un número a 28 tonalidades, se los cuales, se formaron siete grupos de tonos, ordenados del más oscuro al más claro: café oscuro (1=165C, 2=165B, 3=199A, 4=165A, 5=166A), naranja oscuro (6=167A, 7=164A), café claro (8=164C, 9=164B, 10=199C), naranja claro (11=163D, 12=163C), verde claro (13=195A, 14=196C), amarillo claro (15=160C, 16=161C, 17=162C, 18=160B, 19=161B, 20=162B, 21=160A, 22=161A, 23=162A), crema (24=NN155, 25=155C, 26=155A, 27=159C, 28=196D).

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de la varianza mediante el procedimiento PROC ANOVA y se efectuó la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \geq 0.05$), se utilizó el programa de computo estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2004). La variable color del callo se analizó por medio de estadística descriptiva.

Evaluación de la relación amonio: nitrato en combinación con 2,4-D y 2ip, para la inducción de callo embriogénico. En el presente experimento se tomó como base el medio MS, en el que se modificó sólo la fuente nitrogenada, sin modificar las dosis los componente originales propuestos por Murashigue y Skoog en 1962. En el Cuadro 2 se

indican las cantidades pesadas para obtener cada una de las relaciones amonio: nitrato.

El medio MS aporta 60 mM de N₂, 40 como NO₃ y 20 como NH₄ a partir de Nitrato de Amonio y Nitrato de Potasio y, basados en dos concentraciones de nitrógeno total (15 y 30 mM), se formularon diferentes relaciones amonio: nitrato (0:3, 1:2, 2:1 y 3:0), además se adicionó al medio 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ 2ip. Las sales que no correspondían a fuentes de nitrógenos se pesaron en las cantidades indicadas para el medio MS al cual también se le agregó 4 mg L⁻¹ de Tiamina, 100 mg L⁻¹ Myoinositol, 25 mg L⁻¹ Cisteína, 10 g L⁻¹ Azúcar. El diseño de tratamientos fue factorial 4 x 2 en diseño completamente al azar con diez repeticiones, donde la unidad experimental fue un frasco de cultivo con cuatro explantes.

Cuadro 2. Formulación de medios de cultivo MS (Murashigue y Skoog, 1962) con diferentes relaciones amonio: nitrato utilizados para evaluar la inducción de callo embrionógico en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.).

Macro-nutrientes	Original	15 mM Nitrógeno				30mM Nitrógeno			
		Relaciones amonio: nitrato							
		0.3	1.2	2.1	3.0	0.3	1.2	2.1	3.0
		mg L ⁻¹				mg L ⁻¹			
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O		236.08				472.16			
(NH ₄) ₂ SO ₄			66.07	197.71			132.14	395.42	
KH ₂ PO ₄	170								
MgSO ₄ 7 H ₂ O	370								
KNO ₃	1900	950	475		1900	950			
NH ₄ NO ₃	1650		412.5	412.5		825	825		
CaCl ₂ H ₂ O	440								

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del Nitrógeno en la inducción de callo embriogénico. Los resultados del análisis de varianza para inducción de callo embriogénico bajo el efecto nitrógeno y fitorreguladores, se muestran en el **Cuadro 3**. Se observa que el Nitrógeno produjo un efecto altamente significativo en las variables PC y DC. En lo referente al efecto del 2,4D, esta auxina indujo diferencias significativas en la variable DC, en contraste con el resto de las variables evaluadas. Al analizar los resultados obtenidos de la interacción 2,4-D*2iP*Nitrógeno, se observó un efecto diferencial altamente significativo en la respuesta de DC. Resultados estadísticos significativos se observaron la variable RE en la interacciones 2,4-D*2iP y 2,4-D*Nitrógeno.

En el Cuadro 4, se presentan los resultados del análisis de la varianza en una vía practicado para las variables CF, OC y CC. Se observa que el efecto de nitrógeno influyó de manera altamente significativa para estas tres variables. En lo referente a 2iP, esta citocinina indujo diferencias altamente significativas para las variables CF y CC. En el mismo sentido, el efecto de 2,4-D indujo diferencias altamente significativas para las variables CF y CC, y diferencias significativas en OC. En el caso de las interacciones, se determinaron efectos diferenciales altamente significativos cuando se evaluó CF, OC y CC en la interacciones 2,4-D*Nitrógeno y 2,4-D*2iP*Nitrógeno. Al analizar el efecto de la interacción 2iP*Nitrógeno también se encontraron diferencias altamente significativas en las variables CF y CC.

Cuadro 3. Cuadrados medios para RE, PC y DC obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de diferentes dosis de nitrógeno y hormonas (2,4-D y 2iP), sobre la inducción de callo proembriogénico de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.).

FV	GL	RE		PC		DC	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F	CM	Pr>F
2,4-D	2	0.31	0.359 ^{NS}	0.87	0.5423 ^{NS}	0.69	<0.0001**
2iP	2	0.19	0.526 ^{NS}	1.61	0.3247 ^{NS}	0.01	0.6567 ^{NS}
Nitrógeno	3	0.06	0.884 ^{NS}	30.52	<0.0001**	21.83	<0.0001**
2,4-D*2iP	4	0.94	0.015*	0.60	0.7935 ^{NS}	0.05	0.3117 ^{NS}
2,4-D*Nitrógeno	6	0.72	0.029*	1.72	0.3020 ^{NS}	0.13	0.0063*
2iP*Nitrógeno	6	0.49	0.136 ^{NS}	1.90	0.2419 ^{NS}	0.04	0.3390 ^{NS}
2,4-D*2iP*Nitrógeno	12	0.45	0.125 ^{NS}	1.76	0.2591 ^{NS}	0.10	0.0057**

NS: no significativa; (*) P≤0.05, (**) P≤0.01. RE= explantes con respuesta; PC= peso fresco de callo; DC= diámetro de callo.

Cuadro 4. Cuadrados medios para CF, OC y CC obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto de diferentes dosis de nitrógeno y hormonas (2,4-D y 2iP) sobre la inducción de callo proembriogénico de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.).

FV	GL	CF		OC		CC	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F	CM	Pr>F
2,4-D	2	1.87	0.002**	1.58	0.0328*	1444.9	<0.0001**
2iP	2	7.83	<0.0001**	0.15	0.7080 ^{NS}	24.69	0.0085**
Nitrógeno	3	84.63	<0.0001**	94.27	<0.0001**	602.04	<0.0001**
2,4-D*2iP	4	3.96	<0.0001**	1.93	0.0025**	30.96	<0.0001**
2,4-D*Nitrógeno	6	8.45	<0.0001**	1.81	0.0008**	1175.89	<0.0001**
2iP*Nitrógeno	6	4.44	<0.0001**	0.48	0.3914 ^{NS}	222.24	<0.0001**
2,4-D*2iP*Nitrógeno	12	2.15	<0.0001**	1.67	<0.0001**	161.23	<0.0001**

NS: no significativa; (*) P≤0.05, (**) P≤0.01. CF=porcentaje de área de friabilidad, OC= porcentaje de oxidación de callo, CC= color de callo.

Para porcentaje de área de friabilidad de oxidación del callo y de color, la interacción fue altamente significativa al utilizar en el medio de cultivo las hormonas 2,4-D, 2iP y nitrógeno como nutriente. En el número de explantes no hubo diferencias significativas.

Por otra parte, la variabilidad de las características evaluadas e interpretadas mediante el coeficiente de variación (CV), mostró que los caracteres medidos presentan diferentes niveles de dispersión al utilizar diferentes concentraciones de nitrógeno total, 2,4-D y 2iP en el medio de cultivo MS. En relación a los coeficientes de determinación (R^2), los valores determinados fueron 0.193 para RE, que fue el más bajo, PC (0.270), DC (0.855), OC (0.730), CF (0.876), CC (0.922). El Coeficiente de Variación para RE fue de CV= 14.26, PC (CV=95.66), DC (CV=21.64), OC (CV=63.14), CF (CV=18.82), CC (CV=14.74) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Estadísticos simples obtenidos del análisis de varianza en una vía para evaluar la inducción de callo proembriogénico con base en el efecto de 2,4-D, 2iP y nitrógeno a partir de explantes de hoja, en el cultivo *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedad Biloxi.

Variable	R^2	Media	Mínimo	Máximo	S	CV
RE	0.193	3.870	3.00	4.00	0.5786	14.26
PC	0.270	1.249	0.34	3.90	1.318	95.66
DC	0.855	0.960	0.20	1.42	0.514	21.64
OC	0.730	1.071	0.00	3.30	1.227	63.14
CF	0.876	2.417	1.00	4.00	1.216	18.82
CC	0.922	15.28	2.00	28.00	7.629	14.74

En la Figura 1, se observa la variabilidad de los callos obtenidos en la inducción proembriogénica en explantes de hoja de arándano. En la figura 1A se observa un callo de color blanco proembriogénico, en la figura 2B se observa un callo compacto translúcido y de color rojizo y en la figura 1C se observa un callo compacto color amarillo.



Figura 1. Fotografías que muestran la variabilidad de los callos inducidos en explantes de hoja de arándano por la acción de nitrógeno, 2,4-D y 2iP a las tres semanas (1A), seis semanas (1B) y ocho semanas (1C).

La formación de callo empezó a desarrollarse a las tres semanas de cultivado, se observó que el crecimiento es en el contorno del explante de hoja de arándano (Figura 1A), el callo es compacto durante las siguientes tres semanas (figura 1B) hasta que se empieza a ver diferenciación en las estructuras de este callo compacto aun callo friable, blanco (Figura 1C), este callo permaneció así hasta el día de la evaluación (50 días).

Al hacer la comparación de medias (Tukey $p \leq 0.05$) para la variable respuesta del explante (RE) los resultados son significativos para la interacción 2,4-D y 2ip, y para 2,4-D al combinar con nitrógeno. En la Figura 2 se observa que la aplicación de 0.5 mg L^{-1} de 2iP disminuye el número de explantes con respuesta en un 5 % (para 0.5 mg L^{-1}) y 7.5 % (para 1.5 mg L^{-1}).

En la aplicación de 1 mg L^{-1} de 2,4-D todos los explantes respondieron a la formación del callo. La presencia de estos aditivos al medio incrementa la incrementan la eficiencia del cultivo en la embriogénesis somática, lo cual se manifiesta en mayores tasas de multiplicación de embriones y retención del potencial embriogénico de los tejidos (Sotiropoulos *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos por la incorporación de 2,4-D y 2iP están relacionados con el manejo de oscuridad que se dio a los explantes para prevenir oscurecimiento y favorecer la formación de brotes, como lo recomienda Ziv y Halevy en 1983, de hecho la degradación de 2,4-D es más lenta cuando los explantes se incuban en la oscuridad en comparación cuando se incuban en la luz (Arzate *et al.*, 1998), lo que permite un mayor efecto de esta auxina.

La embriogénesis somática se favorece generalmente mediante incubación en la oscuridad continua (Ammirato, 1987); en *Daucuscarota* L. (Ammirato y Steward, 1971) y *Manihot sculenta* Crantz (Szabados *et al.*, 1993) se emplea la oscuridad para el desarrollo y maduración normal de los embriones somáticos. Actualmente, se ha conseguido inducir con éxito la embriogénesis somática en un número cada vez mayor de especies y explantes de inicio (Castellanos *et al.*, 2011). La obtención del callo embriogénico proporciona el material de inicio para el desarrollo de suspensiones de células embriogénicas, de las cuales es posible producir embriones y regenerar plantas (Rincón *et al.*, 2009).

El uso de 2-4-D es reportado desde 1988 por Vries *et al.*, quien al incorporarlo al medio de cultivo pudo obtener embriones de zanahoria (*Daucus carota* L.) después de 50 días de iniciado el cultivo.

En relación a las concentraciones de nitrógeno 30mM y de 0.5 a 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D favorecen el número de explantes (Figura 2).

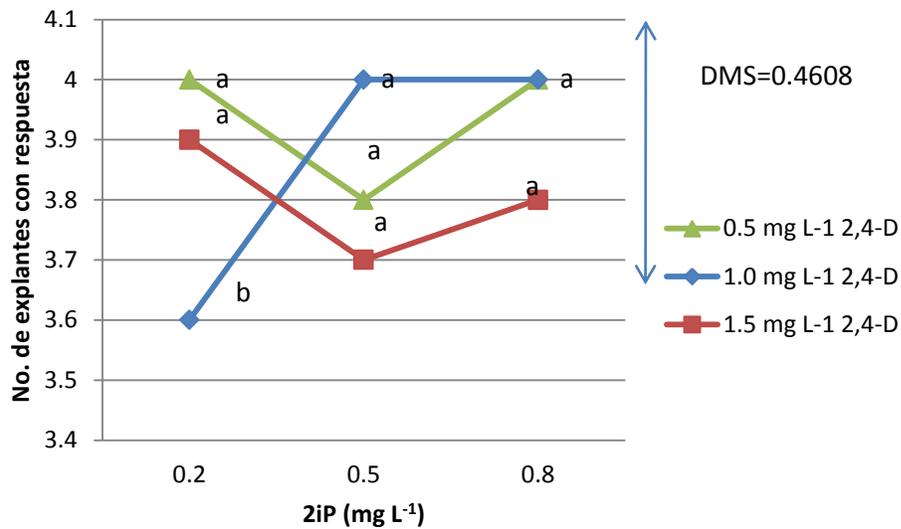


Figura 2. Efecto de la Interacción de 2,4-D con nitrógeno en la respuesta del explante de hoja de arándano para formar callo; la evaluación se hizo a los 90 días.

La comparación de medias (Tukey $p \leq 0.05$) para la variable peso del callo (PC) fue altamente significativa (≤ 0.0001), por la adición de nitrógeno. El mayor peso (1.4 g) se logró con la adición de 90 mM de nitrógeno al medio de cultivo, lo que representa 30 mM más de Nitrógeno (59 %) en el medio MS, Sin embargo, no existen diferencias estadísticas significativas entre las diferentes concentraciones de este ion, a pesar que se observa una relación directa entre la concentración de nitrógeno y el peso del callo (Figura 3).

En la inducción de proembriones somáticos en ave del paraíso se obtuvieron callos con un peso promedio de 74.5 mg y una longitud de 1cm, inferior a lo que se obtuvo en este estudio (Arzate *et al.*, 2008).

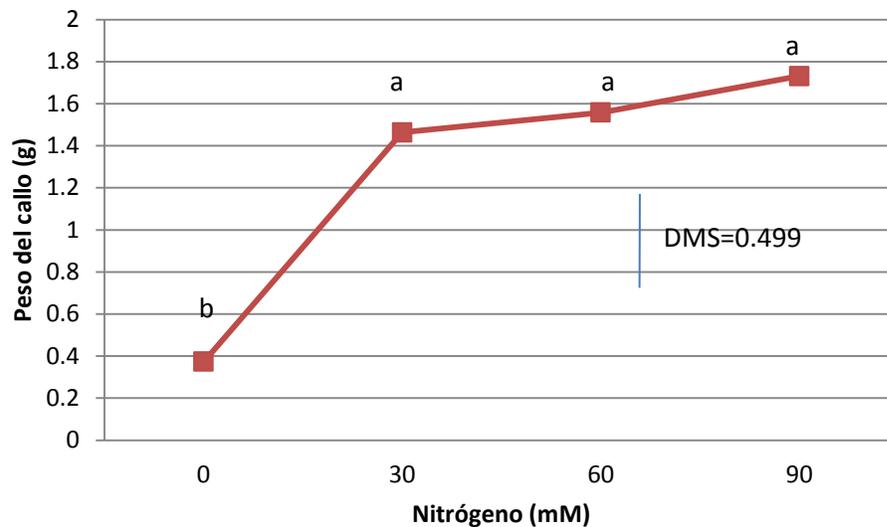


Figura 3. Efecto del nitrógeno el peso del callo en el explante de hoja de arándano.

Como el medio MS provee los seis nutrientes principales (N, P, K, Ca, Mg y S), la reducción en su concentración puede afectar el desarrollo morfogénico (Marschener, 1995).

El resultado obtenido indica una respuesta directa a la fuente de nitrógeno, pero también estudios realizados en embriogénesis somática demuestran que en las etapas tempranas de desarrollo las células embrionarias carecen de nitrato reductasa haciendo muy difícil la reducción de nitratos a nitritos, por lo cual se ha venido utilizando fuentes de nitrógeno orgánico como los aminoácidos que son de más fácil absorción. La utilización de la Glutamina (1 mM), ácido glutámico (10 mM), alanina (1 mM) o la urea (3 mM) son compuestos que podrían sustituir en parte al amonio en el medio de inducción de embriones por su difícil reducción y la fuente de nitrógeno orgánico sería un mecanismo de emergencia para la toma de de nitrógeno si la reducción del nitrato de amonio es deficiente (Kärkönen, 2001).

La comparación de medias (Tukey $p \leq 0.05$) para la variable diámetro del callo (DC) mostró diferencias estadísticas significativas en la interacción de 2,4-D, 2iP y Nitrógeno. El mayor diámetro (1.42 cm) se obtuvo al agregar 1.0 mg L^{-1} 2,4-D, 0.5 mg L^{-1} y 30 mM de Nitrógeno total al medio de cultivo, el menor diámetro del callo se obtuvo al no agregar Nitrógeno (0 mM), aún adicionando cualquier concentración de 2,4-D y 2iP (Figura 4).

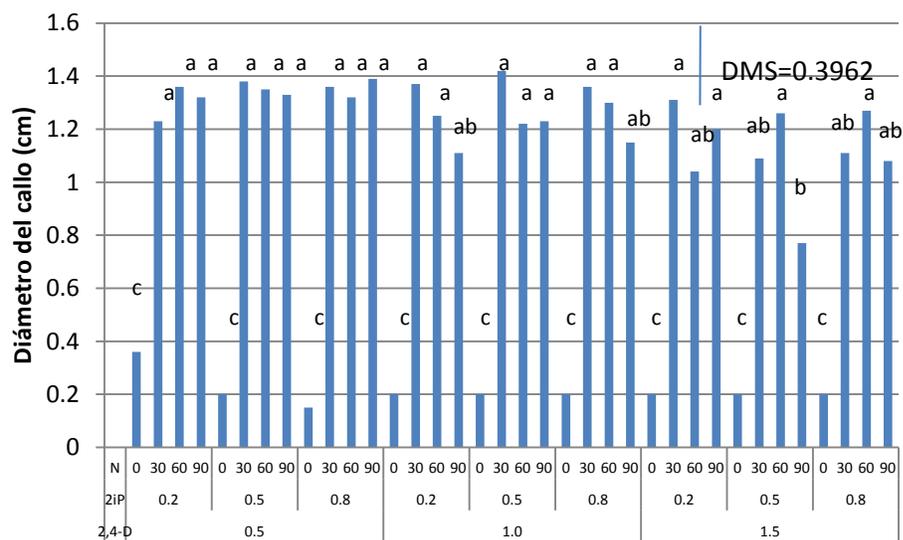


Figura 4. Efecto del nitrógeno en el diámetro del callo en los explantes de hoja de arándano

Al hacer la comparación de medias (Tukey $p \leq 0.05$) para la variable área de oxidación del callo en por ciento (OC), los resultados indicaron la formación de diez grupos. La mayor área de oxidación (76 %) se obtuvo al agregar 0.5 mg L^{-1} de 2,4-D, 0.2 mg L^{-1} de 2iP y 0 mM de Nitrógeno y la menor área de oxidación se obtuvo al agregar 30 mM de Nitrógeno, aún al agregar las diferentes concentraciones de 2,4-D y 2iP (Figura 5).

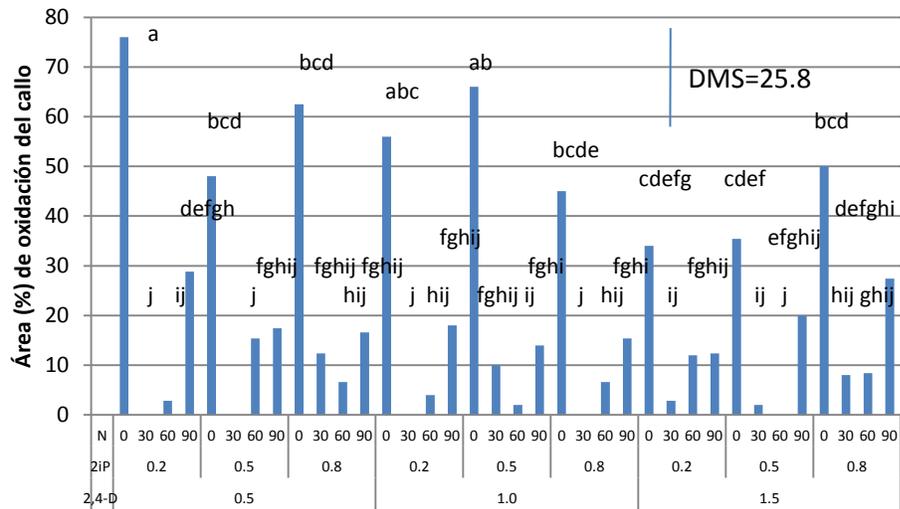


Figura 5. Efecto del 2,4-D, 2iP y nitrógeno en el área (%) de oxidación del callo en explantes de hoja de arándano.

En investigaciones sobre café, los embriones somáticos originados a partir de callos necróticos se formaron de manera sincronizada inicialmente (hasta el estado acorazonado), luego se perdió la sincronización a medida que el cultivo se desarrollaba; estos callos necróticos presentaron un aspecto compacto, estaban distribuidos de manera discontinua en toda la masa de callo (2-7 embriones por callo necrótico) (Menéndez, 1997).

Al hacer la comparación de medias (Tukey $p \leq 0.05$) para la variable área (%) de callo friable, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El mayor variable área (%) de callo friable, se formó al utilizar 0.5 mg L^{-1} 2,4-D, 0.2 mg L^{-1} de 2iP y 60 mM de Nitrógeno total en el medio de cultivo, el menor área se formó al agregar nitrógeno al medio de cultivo (0 mM) aunque se haya agregado diferentes concentraciones de fitohormonas (Figura 6). Las sales inorgánicas del medio MS diluidas al 50 % con la incorporación de una citocinina (2 mg L^{-1} de Kinetina) promovió

la formación de callo en eucalipto (Martínez, 2004), esto también coincide con los reportado por Inoue *et al.*, (1999) quienes mencionan que la utilización de niveles elevados de citocininas o de auxinas promueven el establecimiento de callos en muchos de los explantes cultivados *in vitro*.

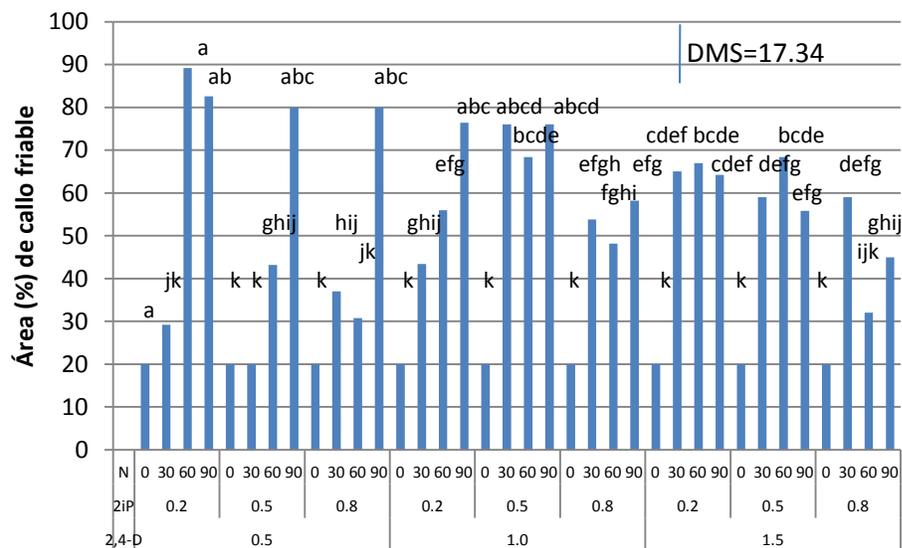


Figura 6. Efecto del 2,4-D, 2iP y nitrógeno en el área (%) de callo friable a partir de explantes de hoja de arándano.

En los últimos años se han reconocido algunos marcadores moleculares que indican la transición de células somáticas a células embriogénicas; además de alrededor de 21 genes específicos o relacionados con la embriogénesis han sido clonados a partir de embriones somáticos (Zimmerman, 1993). En 1987, Choi *et al.*, describieron el aislamiento de genes los cuales se expresaban durante la embriogénesis somática, así como el conocimiento de su función mediante técnicas de biología molecular. Estos genes son los denominados LEA (Late Embryogenesis Abundant), los que se regulan por la vía metabólica del ácido abscísico y se expresan durante la embriogénesis tardía, así como el caso de *dc3* y *EMB-1* (Wurtele *et al.*, 1993) y *dc8* (Hatzapoulos *et al.*,

1990). También se ha aislado el gen *ep1*, exclusivo de células no embriogénicas (Van Engelen *et al.*, 1991). En cultivos celulares de *Medicago sativa* L. se encontraron dos proteínas análogas a la *ep-1* que disminuyen considerablemente su concentración al eliminar el 2,4-D del medio de cultivo (Poulsen *et al.*, 1996).

Al hacer la evaluación de la variable color del callo se observó que al no agregar nitrógeno al medio de cultivo, los explantes tenían una coloración café oscura, pero sólo a 0.5 y 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, ya que al aumentar la concentración de esta auxina a 1.5 mg L⁻¹ la coloración era color crema. La mayoría de los experimentos tenían una tonalidad de amarillo, exceptuando cuando se adicionaba al medio de cultivo 1.5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 80 mg de Nitrógeno total, a cualquiera de las concentraciones de 2iP (0, 0.2 y 0.5 mg L⁻¹). Estas tonalidades de color se muestran en la **Figura 7**.

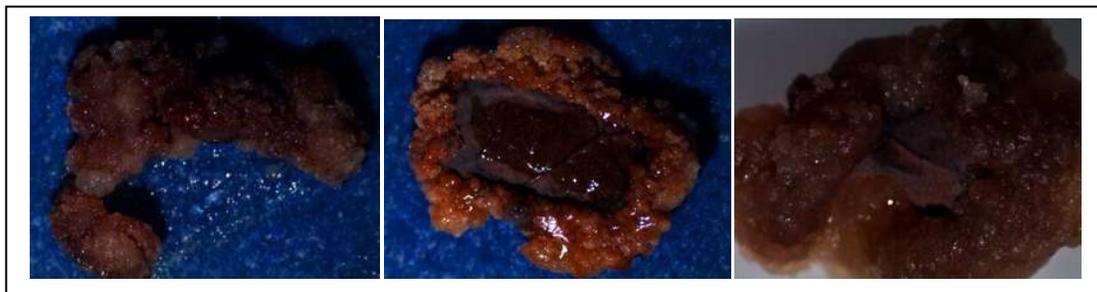


Figura 7. Coloración de los callos por efecto del nitrógeno total en la inducción de callo pro embriogénico de arándano variedad Biloxi.

Los experimentos para evaluar el efecto del nitrógeno para la inducción de callo embriogénico muestran que se obtuvo una mayor respuesta cuando se adiciona al medio de cultivo 15 mM y 30 mM de Nitrógeno.

Efecto de la relación amonio: nitrato en la inducción de callo embriogénico. Los resultados del análisis de varianza para inducción de callo embriogénico bajo el efecto

del nitrógeno y de la relación amonio: nitrato en el medio de cultivo MS, se muestran en el **Cuadro 7**. Se observa que el nitrógeno produjo un efecto altamente significativo en las variables PC y DC. En lo referente a la relación amonio: nitrato, esta también indujo diferencias altamente significativas en las variables PC y DC, en contraste con la variable RE. Al analizar los resultados obtenidos de la interacción Nitrógeno*Amonio: Nitrato, se observó un efecto diferencial altamente significativo en la respuesta de PC y DC.

En el **Cuadro 8**, se presentan los resultados del análisis de la varianza en una vía practicado para las variables OC y CC. Se observa que el efecto de nitrógeno influyó de manera altamente significativa para la variable OC. En lo referente a la relación amonio: nitrato, indujo diferencias altamente significativas para estas dos variables. En el mismo sentido, la interacción Nitrógeno*Amonio: Nitrato, determinó efectos diferenciales altamente significativos cuando se evaluó OC y CC.

En relación a los coeficientes de determinación (R^2), los valores calculados fueron para CC (0.294) que fue el valor más bajo, RE (0.088), PC (0.880), DC (0.631), OC (0.948). El Coeficiente de Variación para RE fue de CV= 2.803, PC (CV= 27.45), DC (CV= 35.42), OC (CV= 42.59), CC (CV= 20.91) (**Cuadro 9**).

Cuadro 7. Cuadrados medios para RE, PC y DC obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto la relación amonio: nitrato en la inducción de callo proembriogénico.

FV	GL	RE		PC		DC	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F	CM	Pr>F
Nt	1	0.012	0.3207 ^{NS}	0.223	<0.0001 ^{**}	0.722	0.0035 ^{**}
A: N	3	0.012	0.3979 ^{NS}	1.650	<0.0001 ^{**}	2.690	<0.0001 ^{**}
Nt* A: N	3	0.012	0.3979 ^{NS}	0.898	<0.0001 ^{**}	0.341	0.0076 ^{**}

NS: no significativa; (*) P≤0.05, (**) P≤0.01

Nt= nitrógeno total, A=amónio, N=nitrato

Cuadro 8. Cuadrados medios para OC y CC obtenidos del análisis de la varianza para evaluar el efecto la relación amonio: nitrato en la inducción de callo proembriogénico.

FV	GL	CM	OC		CC	
			Pr>F	CM	Pr>F	
Nt	1	5.512	<0.0001**	1.512	0.7398 ^{NS}	
A: N	3	1.845	<0.0001**	56.812	0.0088**	
Nt* A: N	3	1.845	<0.0001**	78.945	0.0013**	

NS: no significativa; (*) P≤0.05, (**) P≤0.01 Nt= nitrógeno total, A=amonio, N=nitrato

Cuadro 9. Estadísticos simples obtenidos del análisis de varianza en una vía para determinar la inducción de callo proembriogénico con base en el efecto de 2,4-D, 2ip y la relación amonio: nitrato, a partir de explantes de hoja, en el cultivo *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedad Biloxi.

Variable	R ²	Media	Mínimo	Máximo	S	CV
RE	0.088	3.987	3.90	4.00	0.111	2.803
PC	0.880	0.368	0.18	0.95	0.279	27.45
DC	0.631	0.795	0.62	1.32	0.443	35.42
OC	0.948	0.262	0.00	1.10	0.470	42.59
CC	0.294	17.63	14.20	21.80	7.729	20.91

En la **Figura 8** se muestra la variabilidad del callo inducido por la acción de hormonas, Nitrógeno total y la relación del amonio: nitrato en el medio de cultivo.

La caracterización de las estructuras embriogénicas y no embriogénicas es útil y necesaria para el establecimiento de diferencias bioquímicas, moleculares e histológicas entre ellas. Este paso es imprescindible para obtener un cultivo de células homogéneo, que permita futuras manipulaciones en las suspensiones celulares (Noualle y Periart, 1988; Gananapragasam y Vasil, 1992).

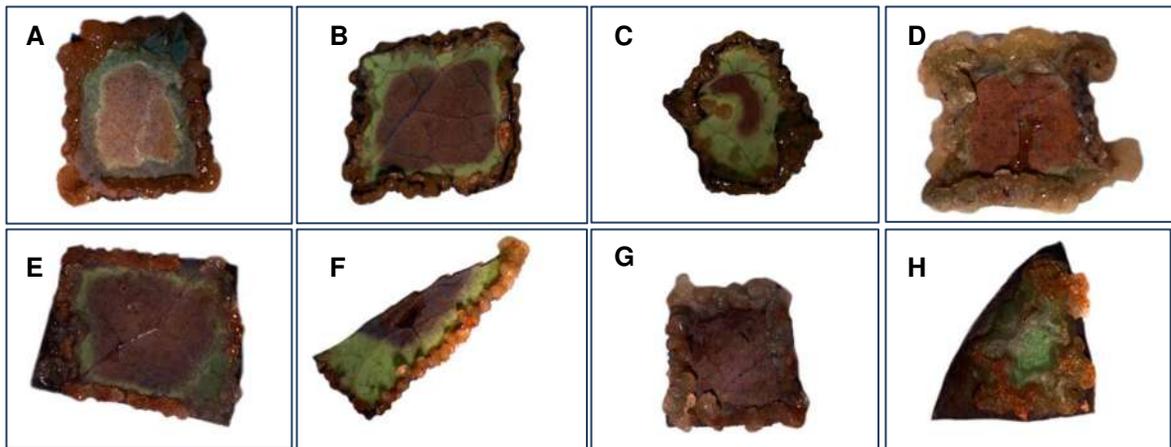


Figura 8. Fotografías de la variabilidad del crecimiento y desarrollo del callo en explantes de hoja de arándano a los 50 días a las diferentes relaciones amonio: nitrato 0: 3 (A y E), 1: 2 (B y F), 2:1 (C y G), 3:0 (D y H). La concentración de nitrógeno total es de 15 mM las fotografías en la parte superior y 30 mM en las de la parte inferior.

Al hacer la comparación de medias (Tukey $p \leq 0.05$) para evaluar la respuesta del explante para la formación de callo de hoja de arándano, no se encontraron diferencias significativas, debido a que los cuatro explantes que formaron la unidad experimental en las diez repeticiones presentaron formación de callo, lo que se corroboró estadísticamente con la media obtenida (3.987), que se muestra en los estadísticos simples (**Cuadro 7**).

Smith y Krikorian (1990), al trabajar la diferenciación de células de zanahoria, pero en un medio de cultivo semisólido libre de reguladores del crecimiento, obtuvieron que con un pH cercano a 4.0 se mantuvo la proliferación y multiplicación de proembriones y sólo cuando el pH fue ajustado a un valor de 5.80, se observaron las restantes etapas de la embriogénesis somática para este cultivo. También con el cultivo de la zanahoria (Jay

et al.,1994), se observó que a pH 4.30 los embriones somáticos no se desarrollaron más allá de la etapa de corazón, mientras que, a valores de 5.80 los embriones somáticos maduraron y dieron lugar a plantas más desarrolladas con grandes raíces y cotiledones verdes individualizados.

Es muy discutido el por qué de esa típica variación del pH. También Chen y Kao (1997) y Hvoslef-Eide (2000) plantearon que la acidificación del medio de cultivo en los biorreactores fue debido a la asimilación de amonio al comienzo del cultivo y un posterior incremento del pH por la activación de la enzima nitrato reductasa la cual produce la reducción del anión nitrato. Mientras que Preil *et al.* (1996), observaron que cuando el pH disminuyó en suspensiones celulares de *Cyclamen persicum*, la concentración de iones amonio y nitratos se mantenía alta (78 y 79%) y disminuían paralelamente. Según Sakano *et al.* (1997), la disminución del pH podría ser debido a la asimilación de iones potasio y la inducción de las enzimas malato sintetasa y citrato sintasa, lo cual provoca cambios en el pH citoplasmático lo cual conduce a la activación de la bomba de protones y la liberación de protones hacia el medio de cultivo e incorporación de iones potasio al interior celular.

La comparación de medias (Tukey $p \leq 0.05$) en la variable peso del callo mostró tres grupos. El mayor peso del callo (0.95) se obtuvo con la concentración total de nitrógeno 30 mM en la relación amonio: nitrato (1:2), el segundo peso (0.64), se obtuvo con la misma relación amonio: nitrato, pero a una concentración total de nitrógeno de 15mM. Las otras relaciones amonio: nitrato (0:3, 2:1 y 3:0), no tienen diferencia significativa entre cada una de ellas (**Figura 9**). A partir de resultados de producción de callo con medios de cultivo modificando, la organización celular del callo, corrobora que hay una marcada influencia que ejercen factores tales como la composición química del medio

de cultivo y las características genéticas del material vegetal a evaluar en respuesta morfológica del material cultivado *in vitro* (González et al., 2001).

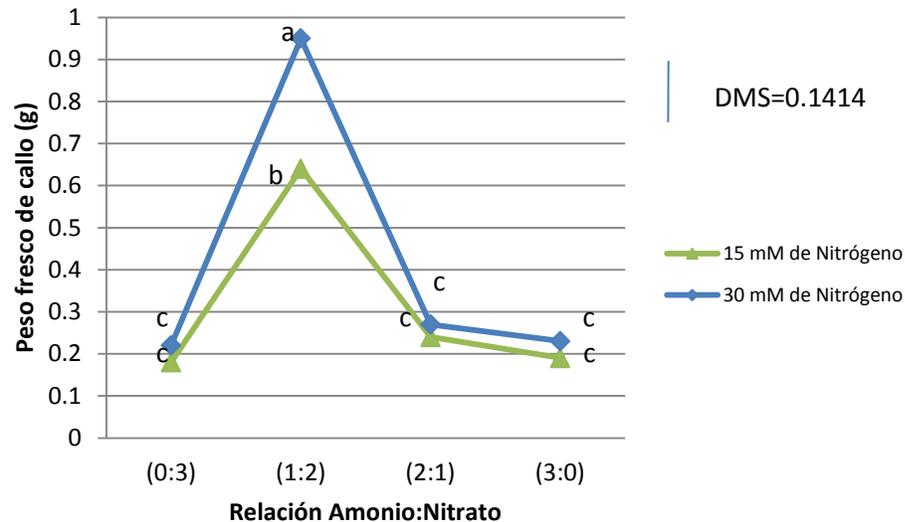


Figura 9. Efecto del nitrógeno y de la relación amonio: nitrato en el peso del callo al utilizar explantes de hoja de arándano para la inducción de callo proembriónico

En experimentos similares sobre la inducción embriones somáticos pero de Eucalipto, se obtuvo un peso de 2.5 g cuando se utilizó TDZ como citocinina en combinación con 1 mg L^{-1} de 2,4-D, similar a lo que se obtuvo en esta investigación, sin embargo, ellos no encontraron diferencias significativas en la interacción de los dos hormonas, además de que no encontraron diferencias significativas en la concentración del medio MS utilizada (Martínez, 2004).

Se han hallado diferencias al comparar células embriogénicas y no embriogénicas en cultivos celulares de zanahoria (Wurtele *et al.*, 1988). El contenido de almidón ha sido mayor en las células embriogénicas, lo que sugiere la posibilidad de que sea degradado más rápidamente en las células no embriogénicas. En la etapa globular y corazón hay un aumento en la síntesis de lípidos, ocurriendo también cambios en el contenido de

ácidos grasos en las etapas tempranas del desarrollo del embrión somático (Thompson y Thorpe, 1989).

En la valuación del diámetro del callo, los resultados indicaron que el mayor diámetro del callo (1.3 cm) se obtuvo con la relación 1:2 amonio: nitrato a una concentración de nitrógeno total de 30 mM. El mismo diámetro del callo (1.3 cm) se obtuvo a la misma relación nitrato amonio (1:2), pero a la mitad de la concentración evaluada (15 mM). En los otros tratamientos no se observa diferencias significativas (0:3, 2:1 y 3:0) (**Figura 10**).

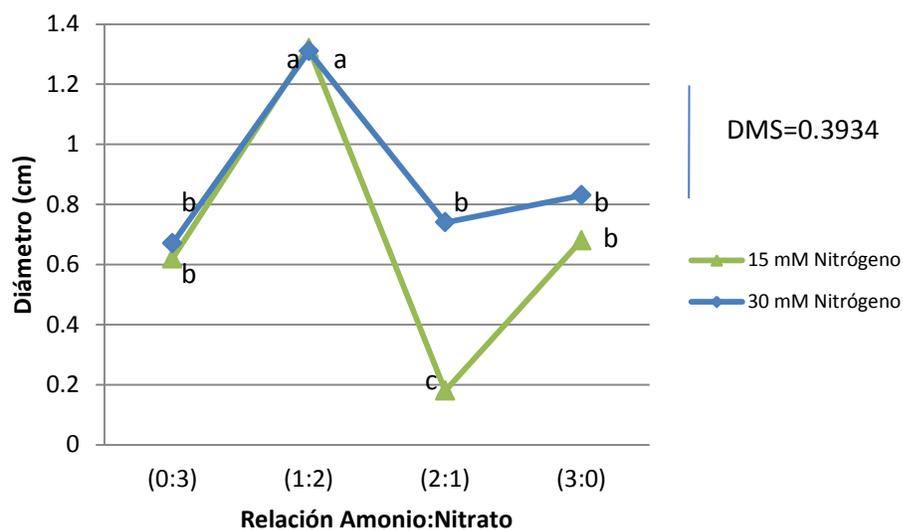


Figura 10. Efecto del nitrógeno y de la relación amonio: nitrato en el diámetro del callo al utilizar explantes de hoja de arándano para la inducción de callo proembriogénico.

En otras investigaciones para incrementar la iniciación o inducción de embriones en *P. maximartinezii* y *P. sylvestris*, se probaron relaciones extremas de NH_4 y NO_3 y se evaluaron diferentes medios (NH_4 : NO_3) (80:20, 40:60 y 10:60), además del intercambio de embriones inmaduros entre los medios, se concluyó que el NO_3 promueve un alto nivel de iniciación y hasta inducción de embriones somáticos. Permite hasta un 100%

de sobrevivencia, y es el activador o promotor de desarrollo de embriones capaces de convertirse en plántulas, aun en genotipos recalcitrantes (Ramírez, 2003),

En la evaluación de la variable área de callo friable, al hacer la evaluación visual de la formación del callo en los explantes de hoja de arándano no se observó la formación de callo friable, sólo la presencia de callo compacto en el contorno del explante.

Al hacer la comparación de medias (Tukey $p \leq 0.05$) para la variable área (%) de oxidación del callo. Se observó que el callo que crece con la adición de 15 mM de nitrógeno total en el medio de cultivo MS, hay más área de oxidación (en comparación con el medio al que se le adicionó el doble de nitrógeno total (30 mM) (**Figura 11**).

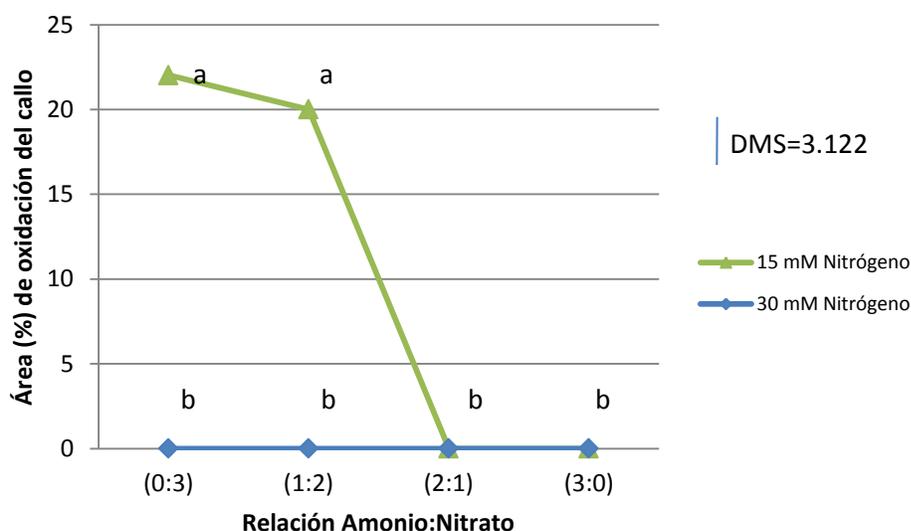


Figura 11. Efecto de la relación amonio: nitrato en el porcentaje de oxidación del callo al utilizar explantes de hoja de arándano para la inducción de callo proembriogénico.

Al hacer la comparación de medias (Tukey $p \leq 0.05$) para la variable color del callo se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, se formaron tres grupos de las tonalidades del color, sin embargo pertenecen a dos grupos de colores, el verde claro y el amarillo, ya que al adicionar 30 mM de nitrógeno total al

medio de cultivo con una relación amonio: nitrato 2:1, el color que predominó fue el verde claro, y una concentración de 15 mM de nitrógeno con una relación de amonio: nitrato 1:2, el color que predominó fue el una tonalidad del amarillo (161C), en los demás tratamientos, hubo una variación de tono del amarillo. Los resultados se muestran en la **Figura 12**.

Los callos inducidos a partir de raquis y hojas de estacas se mostraron compactos, con coloración de blanquecina a verde y ausencia de oxidaciones en cedro (Rodríguez 2011).



Figura 12. Coloración de los callos por efecto de la relación amonio: nitrato en la inducción de callo pro embriogénico de arándano variedad Biloxi.

La evaluación de las variables peso, diámetro y oxidación del callo, concuerdan en que el mejor tratamiento es en el que se le adiciona al medio de cultivo MS 30 mg de nitrógeno total, sin hacer modificaciones en la relación amonio: nitrato (1:2) propuesta por Murashigue and Skoog en 1962.

CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones experimentales bajo las cuales se realizó el presente trabajo de investigación, se concluye lo siguiente:

La respuesta del nitrógeno en el medio de cultivo para la inducción de callo proembriogénico en el cultivo *in vitro* de arándano a partir de explante de hoja se logró con la adición de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ de 2iP con un balance de 30 mM de nitrógeno total.

La relación amonio nitrato influyó para la inducción de callo proembriogénico en el cultivo *in vitro* de arándano a partir de explante de hoja, este se logró con la adición de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ de 2iP con un balance, con una relación amonio: nitrato (1:2).

DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo de investigación se identificaron tres hongos fitopatógenos limitando el cultivo *in vitro* de arándano variedad Biloxi *Alternaria sp.*, *Pestalotiopsis sp.* y *Epicoccum sp.* En estudios hechos con este cultivo, en otros países como Argentina, se ha observado que *Alternaria tenuísima* es el microorganismo de mayor incidencia y prevalencia en todas las localidades y épocas del año (Wright, 2004). En Georgia, otros estudios fitopatológicos sobre hongos causantes de enfermedades foliares en diferentes variedades de arándano, se concluye que el hongo *Pestalotiopsis sp.*, causa la tercera enfermedad foliar más común en esta zona (25 % de prevalencia) que provoca defoliación (Scherm *et al.*, 2007). En el caso de *Epicoccum*, se ha encontrado en brotes de arbustos de arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.) en Lublin Polonia, donde encontraron que *Epicoccum purpurascens myrtilli* tuvo una frecuencia de ocurrencia en los tres años que duró este estudio (2001-2003). Este hongo fue controlado por la sustancia activa quitosano, que es un polímero que se encuentra en estado natural en exoesqueletos de crustáceos (Bautista–Baños *et al.*, 2003; Pieta *et al.*, 2004; Wojdyla *et al.*, 1997), en el caso del control de *Alternaria alternata* en los cultivos de uvas de mesa y vides viníferas (Syngenta, 2007), se ha utilizado ciprodinil y fludioxonil, para *Pestalotiopsis sp.*, se han utilizado otros fungicidas como mancozeb 80%, mancozeb combinado con cymoxynil y difenoconazole³ (Younis, M., 2004); en el presente trabajo la utilización de la mezcla de ciprodinil y fludioxonil para el control químico *in vitro* de los tres hongos identificados en hojas con tallo de arándano variedad Biloxi fue exitosa.

³ 3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il] fenil-4-clorofenil éter

El cultivo *in vitro* aséptico de arándano se logró con el control de los hongos fitopatógenos mediante la fumigación de las plantas con ciprodinil y fludioxonil cada quince días aproximadamente, esto redujo la contaminación de un 100 % a un 5 %.

En general la embriogénesis somática se presenta cuando los callos se hacen embriogénicos y forman un embrión que se transforma en una raíz y un sistema aéreo; para este proceso es necesario agregar citocininas y auxinas al medio de cultivo para que se presente la embriogénesis (Salisbury y Ross, 2000). En este trabajo experimental, la inducción de callo embriogénico en arándano variedad Biloxi estuvo influenciada por el tipo de explantes, temperatura, tipo y nivel de citocininas (2IP, Kinetina y BA) y 2,4-D. Se ha observado que entre los factores que determinan la respuesta del cultivo *in vitro*, tanto en las diferencias en el metabolismo vegetal, como en los niveles endógenos de nutrimento, se encuentran la especie y el tipo de explantes utilizado (Gomes y Fernández-Ferreira, 1996). En especies leñosas, se ha observado que el uso de tejidos juveniles tiene mayor éxito en las diversas técnicas de cultivo de tejidos. Además de la edad del tejido, también influye el genotipo, el tipo de tejido y la estación o época del año de obtención de los explantes (Ahuja, 1992). En esta investigación, los explantes a partir de yema manifestaron una mejor respuesta para la variable PC, menor área (%) de necrosis del callo, en los explantes a partir de hoja, la respuesta fue mejor en DC y área (%) de callo friable, esto se debe posiblemente a que en los explantes de tallos con una yema, se encuentran células indiferenciadas que por la acción de las citocininas se diferencian (De Klerk, 1997), por lo que la formación de callo en explantes a partir de yemas es más inducible que en explantes de hoja; sin embargo, la inducción de callo friable, se evidenció en el callo con explantes de hoja.

En relación al efecto de los fitorreguladores, el 2,4-D se ha utilizado para favorecer diferentes procesos morfogénicos, entre los que se encuentran, formación de callos (Robert *et al.*, 1987); establecimiento de ápices (González *et al.*, 1996-1997); multiplicación axilar y enraizamiento (Robert *et al.*, 1992; Peña *et al.*, 1996) y endurecimiento (Eastmond *et al.*, 2000). En este trabajo, las variables DC, OC y CF mostraron una respuesta diferente, estadísticamente significativa, a la aplicación de 2,4-D, por lo que constituye un fuerte inductor de desdiferenciación celular (Krikorian *et al.*, 1990). De la misma manera, se ha indicado que la adición de las citocininas en el medio de cultivo juega un papel importante en la germinación de los embriones, pues éstas contrarrestan el efecto provocado por las auxinas durante la inducción y proliferación celular (Gómez, 1994). La citocinina sintética BA, es tal vez más usada que la kinetina y la zeatina. La 2iP también es ampliamente utilizada en cultivo de tejidos. Tanto auxinas como citocininas regulan la división celular, afectando la replicación de ADN y controlando los eventos principales de la mitosis, respectivamente (Gaspar *et al.*, 1996). La generación de una planta nueva a partir de callo es variable, con frecuencia, en relaciones de citocinina/auxina relativamente altas, se desarrolla sólo al principio el sistema aéreo y después se forman raíces adventicias espontáneamente de los tallos, mientras todavía están en el callo. La embriogénesis se presenta cuando los callos se hacen embriogénicos y forman un embrión que se transforma en una raíz y un sistema aéreo. En este trabajo, se observó que la utilización de Kinetina produjo mayor PC y CF, en comparación con 2iP y BA en la inducción de callo proembriogénico en arándano variedad Biloxi a partir de explantes de hoja en el medio WPM. Tal es el caso de Hamama *et al.* (2003), quienes estudiaron la regeneración de plantas de jujoba vía embriogénesis somática y encontraron un bajo porcentaje de germinación de

embriones utilizando una combinación de 2,4-D (4,52 μM) y BAP (4,43 μM). Reportes de diferentes investigaciones resaltan la importancia de emplear relaciones auxina/citocinina para lograr procesos morfogénicos (Vasic *et al.*, 2001). Por lo general, se requiere la combinación de dos o más reguladores de crecimiento de diferentes clases, aplicados simultánea o secuencialmente, para obtener regeneración. En este mismo sentido, en trabajos (Gaspar *et al.*, 1996) hechos en zanahoria y tabaco, algunas de las citocininas mostraron alta actividad, pero sólo en presencia de una auxina y obedecen a la totipotencia de la célula vegetal que se ve estimulada por la adición de reguladores, que actúan sobre el ciclo celular. En esta investigación se observa de manera similar que existen efectos diferenciales altamente significativo en la respuesta de CF en la interacciones 2,4-D*Cit y 2,4-D*[Cit]*Cit, mientras que en la interacción [Cit]*Cit, sólo se observaron diferencias significativas en CF.

En relación a la variable temperatura, no es solamente importante porque pueda afectar al crecimiento del cultivo sino también porque puede ser un factor que induzca otros procesos fisiológicos, ya que a bajas temperaturas las cadenas hidrofóbicas de los ácidos grasos en las membranas se encuentran en fase gel y a medida que la temperatura aumenta, se producirá la transición hacia la fase líquida, esto es importante pues la funcionalidad de las membranas biológicas requiere de cierta fluidez que permita el movimiento transversal y lateral de los ácidos grasos, proteínas transportadoras, sustratos, productos de la enzimas asociadas a las membranas, y el transporte de electrones. Por ello, es necesario que las membranas biológicas se encuentren a una temperatura superior a su temperatura de cambio de fase (T_c)⁴ (Azcon-Bieto y Talón, 2001). Además, la temperatura baja tiene un efecto depresivo en

⁴ Temperatura a la que se produce la transición de fase gel-líquido.

los procesos fisiológicos en general (Margaleff, 1977), afecta el contenido y estado de los ácidos nucleicos, agua, proteínas, lípidos, reguladores de crecimiento, así como el estado de los sistemas membranosos en las células (Berry y Bjorkam, 1980; Li, 1984). En esta investigación, se observó que la temperatura influyó de manera altamente significativa en las variables PC, DC y OC. En cuanto a las interacciones solo se determinó la existencia de un efecto diferencial cuando se evaluó el PC en la interacción 2iP*t y 2,4D*2iP*t, esto se debe posiblemente a que sólo se utilizaron dos tratamientos extremos de temperatura, por lo que es necesario hacer evaluaciones que incluya un mayor número de temperaturas que permita observar el su efecto en la inducción de callo embriogénico en arándano. Adicionalmente, la inducción de callo embriogénico también estuvo influenciado por el efecto de nitrógeno total y de la relación amonio: nitrato en el medio de cultivo MS. Al respecto, Castellanos *et al.*, (2011), indicaron la inducción exitosa de la embriogénesis somática en un número cada vez mayor de especies y explantes.

Por otra parte, las formas iónicas de nitrógeno afectan la absorción de otros nutrimentos, pues al incorporarse en ambas formas se altera el balance catión-anión, como los cambios en la acumulación de aniones orgánicos, así como los cambios de pH del medio y el citosol (Marschner, 2002). Preece y Sutter (1991), señalan que las formas iónicas del nitrógeno en el cultivo *in vitro*, pueden afectar la desdiferenciación, diferenciación, crecimiento y desarrollo de los explantes u órganos en formación. En el cultivo *in vitro*, el nitrato y amonio son importantes para la diferenciación de la planta (Halperin y Wetherell, 1965; Reinert *et al.*, 1967) y la promoción y desarrollo embrionario (Joy *et al.*, 1996). El contenido de nitrógeno total, la relación nitrato-amonio (tanto orgánico como inorgánico), así como la fuente de nitrógeno, tienen efectos en la

respuesta de la inducción de embriones somáticos en los explantes (Wetherell y Dougall, 1976; Mordhorst y Lorz, 1993; Grimes y Hodges, 1990). En este trabajo, los resultados obtenidos al analizar el efecto del nitrógeno, se observó que este produjo un efecto altamente significativo en las variables PC, DC, CF, OC y CC cuando se utiliza la mitad de las sales del medio MS, esto coincide con los reportado en eucalipto (Martínez, 2004), pues promovieron la formación de callo con sales inorgánicas del medio MS diluidas al 50 % con la incorporación de una citocinina (2 mg L⁻¹ de Kinetina).

En lo referente a la relación nitrato: amonio, esta también indujo diferencias altamente significativas en la variables PC, DC, OC y CC. Al analizar los resultados obtenidos de la interacción Nitrógeno*Amonio: Nitrato, se observó un efecto diferencial altamente significativo en la respuesta de PC, DC, OC y CC, lo que coincide con lo obtenido por Fuentes-Cerda *et al.*, (2001), donde la respuesta embriogénica de explantes foliares de *Coffea arabica* L. mejoró reduciendo el Nitrógeno total inicial, sin embargo, el incremento la concentración de NH₄ que de NO₃ y en este trabajo se observó que la relación amonio: nitrato en el establecida medio MS fue la mejor (1:2). En otras investigaciones, en el género Pinus, el NO₃ promueve un alto nivel de iniciación y hasta inducción de embriones somáticos y permite hasta un 100% de sobrevivencia, además es el activador o promotor de desarrollo de embriones capaces de convertirse en plántulas, aun en genotipos recalcitrantes (Ramírez *et al.*, 2009).

BIBLIOGRAFÍA

- Arzate F A, J Piña, H Zavaleta (2008)** Inducción de proembriones somáticos en Ave del Paraíso (*Strelitzia Reginae* Banks). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31(992): 183-186.
- Azcón-Bieto J, M Talón (2008)** Universidad de Barcelona. McGraw-Hill Interamericana de España. 522 pp.
- Biasi L A, I R SS Passos, C V Pommer (1998)** Micropropagación de porta injertos de vid Jales. *Revista Brasileña Agropecuaria* 33: 1587-1594.
- Castellanos H, D Ríos, M Sánchez-Olate, C Wehenkel, J Corral (2011)** Proliferación de embriones somáticos de *Nothofagus alpina*: efecto de la fuente de nitrógeno orgánico exógena. *Madera y Bosques* 17(2), 2011:35-46.
- Chen S J, C H Kao (1997)** Ammonium inhibited growth of suspension-cultured rice cells as affected by medium pH. *Plant Growth Regul.* 21: 1-6.
- Cunha A, M Fernandez-Ferreira (1999)** Influence of médium parameters on somatic embryogenesis from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissum* L.). Efec of carbon source, total inorganic nitrogen and balance between ionic forms and interaction between calcium and zeatin. *Journal of Plant Physiology* 155:591-597.
- Dzazio P M, L A Biasi, F Zanette (2002)** Micropropagación de porta- injertos de id "420-A". *Revista Brasiñena de Fruticultura* 24:759-764.
- Ewa U K, M D Gaj, A Ujczak, E Mazur (2007)** Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*(L.) Heynh. Volume 226, Number 3 (2007), 619-628. Fuentes-Cerda, C. F. J.; Monforte-González, M.; Méndez-Zeel,
- Fuentes-Cerda C F J, M Monforte-González, M Méndez-Zeel M, R Rojas-Herrera, V M Loyola-Vargas (2001)** Modification of the embryogenic response of *Coffea arabica* by the nitrogen source. *Biotechnology Letters*, 23 (16): 1341-1343.
- Gananapragasam S, I K Vasil (1992)** Cryoconservation of immature embryos, embryogenic callus and cell suspension cultures of gramineous species. *Plant Science* 83: 205-215.
- Grimes H D, Hodges T K (1990)** The inorganic $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.) *Journal of Plant Physiology* 136:362-367
- Hatzapoulos P, F Fong, Z R Sung (1990)** Abscisic acid regulation of DC8, a carrot embryogenic gene. *Plant Physiol* 94: 690-695
- Hvoslef-Eide T (2000)** Bioreactors for Propagation of Ornamental Plants. EIn: Strømme, E (ed) *Advances in Floriculture Research* pp. 132-142. Agricultural University of Norway

- Jay V Genestier S, J C Courduroux (1994)** Bioreactor studies of the effect of medium pH on carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 205-209.
- Joy R W, D D Mcintyre, H J Vogel, T A Thorpe (1996)** Stage-specific nitrogen metabolism in developing carrot somatic embryos. *Physiol Plant* 97, 149-159.
- Kärkönen A (2001)** Plant tissue cultures as model for tree physiology: Somatic embryogenesis of *Tilia cordata* y Lignin biosynthesis in *Picea abies* suspension cultures as case studies. University of Helsinki. Revisado febrero, 2012. <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/mat/bioti/vk/karkonen/planttis.pd>
- Marschner H (1995)** Mineral nutrition of higher plants, 2nd edition, Academic Press, London.
- Martínez R R, H S Azpiroz, J L Rodríguez de la O, V M Cetina Alcalá, M A Gutierrez (2004)** Embrioénesis Somática de Eucalyptus Grandis Hill Ex Maiden y Eucalyptus Urophylla S. T. Blake. *Revista Chapingo. Eriencias forestales y del ambiente*, año/vol. 10, no. 002. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, México pp. 83-92.
- Menéndez A, E García (1997)** Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". *Protoplasma*, 199: 208 - 214.
- Mordhorst, A. P.; Lorz, H. (1993)** Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture media *Journal of Plant Physiology* 142:485-492
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Noualle CH, Petiart, V (1988)** Semecens artificielles: Sueños y Realidades. *Biofutur* 67: 33-38.
- Pérez-Tornero O, L Burgos (2000)** Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63:133-141.
- Poulsen G B, G Frugis, M Albrechten, D Marroti (1996)** Synthesis of extracellular proteins in embryogenic and non-embryogenic cell cultures of alfalfa. *Plant Cell Tiss Org Cult* 44: 257-260.
- Qiguang Y, P E Read, CD Feltman, M A Hosiern (1985)** Effect of medium constituents and rooting regime on in vitro cultures of *Castanea mollissima* and *C dentata*. *HortScience* 20:593.
- Rodríguez R L, A Díaz (2011)** Introducción a la embriogénesis somática en cedro (*Cedrela odorata* L.). Instituto de Investigaciones del Tabaco. Cuba. 12 (1): 2011.
- Roubelakis-Angelakis K A, K A Loulakakis (1992)** Ammonium-induced increase in NADH-glutamate dehydrogenase activity is caused by de novo synthesis of the α -subunit. *Planta* 187: 322-327.

- Rugini E (1984)** *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae* 24: 123-134.
- Singha S, G H Oberly, E C Townsend (1987)** Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during *in vitro* shoot proliferation of crabapple and pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 11:209-220.
- Smith D L, A D Krikorian (1990)** Somatic embryogenesis of carrot in hormone-free medium: external pH control over morphogenesis. *American Journal Botany* 77: 1634-1647.
- Welander M, N T Welander, A S Brackman (1989)** Regulation of *in vitro* shoot multiplication in *Syringa*, *Alnus* and *Malus* by different carbon sources. *J. Hortic. Sci.* 64:361-366.
- Wetherell D F, D K Dougall (1976)** Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiologia Plantarum, Copenhagen* 37: 97-103.
- Zimmermann R H, I Fordham (1985)** Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. *Journal of American Society for Horticultural Science, Alexandria* 110(1): 34-38.
- Zimmermann R H, W Volkandt, B Wittich (1993)** Synaptic vesicle life cycle and synaptic turnover. *J Physiol Paris* 87(3): 159-70.
- Ziv M, A H Halevy (1983)** Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. *Hort Sci.* 18:434-436.