

Micropropagación de *Vaccinium corymbosum* en medio Murashige y Skoog (1962), suplementado con 6-bencilaminopurina

Micropropagation of *Vaccinium corymbosum* in Murashige and Skoog medium (1962), supplemented with 6-benzylaminopurine

¹María Gutiérrez-Castillo, ¹Alexandra Linares-Armas, ¹Eloy López-Medina, ²José Mostacero-León, ¹Armando Gil-Rivero, ¹Angélica Lopéz-Zavaleta y ²Anthony De La Cruz-Castillo.

RESUMEN

Vaccinium corymbosum “arándano”, es un frutal que pertenece a la familia de las Ericaceae que posee un alto valor nutricional y medicinal. La biotecnología vegetal emplea la micropropagación como una herramienta que permita la obtención de numerosos plantines en una menor proporción de tiempo, para ello es necesario estandarizar la concentración de medios de cultivo y reguladores de crecimiento. Ante la necesidad de un mayor conocimiento en esta área, se propuso como objetivo de investigación determinar la concentración óptima de la 6-bencilaminopurina (BAP) en medio Murashige y Skoog, 1962. La fase experimental se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Papa y Cultivos Andinos de la Universidad Nacional de Trujillo. Donde se utilizaron entrenudos provenientes de plantas madres previamente tratadas y acondicionadas, para ser establecidas en medio de cultivo Murashige y Skoog con cinco tratamientos de BAP: T1 (0 ppm), T2 (8 ppm), T3 (10 ppm), T4 (12 ppm) y T5 (15 ppm). Se empleó un diseño experimental completamente al azar, aplicando ANOVA y Tukey. Se encontró diferencias significativas entre los tratamientos, para las variables longitud de tallo ($0.0403 < p$) y número de hojas ($0.0132 < p$) en el establecimiento *in vitro*. Se concluye que el BAP a la concentración de 15 ppm es el más óptimo para la micropropagación *in vitro* de *V. corymbosum* “arándano”.

Palabras clave: Micropropagación, arándano, 6-bencilaminopurina, ácido indolbutírico, Murashige y Skoog.

ABSTRACT

Vaccinium corymbosum "cranberry" is a fruit that belongs to the family of Ericaceae that has a high nutritional and medicinal value. Plant biotechnology uses micropropagation as a tool that allows obtaining numerous seedlings in a smaller proportion of time, for this it is necessary to standardize the concentration of culture media and growth regulators. Given the need for greater knowledge in this area, it was proposed as a research objective to determine the optimal concentration of 6-benzylaminopurine (BAP) between Murashige and Skoog, 1962. The experimental phase was developed in the Biotechnology Laboratory

of the Institute of Potato and Andean Crops of the National University of Trujillo. Where internodes from previously treated and conditioned mother plants were used, to be established in Murashige and Skoog culture medium with five BAP treatments: T1 (0 ppm), T2 (8 ppm), T3 (10 ppm), T4 (12 ppm) and T5 (15 ppm). A completely randomized experimental design was used, applying ANOVA and Tukey. Significant differences were found between treatments, for the variables stem length ($0.0403 < p$) and number of leaves ($0.0132 < p$) in the in vitro establishment. It is concluded that the BAP at the concentration of 15 ppm is the most optimal for the in vitro micropropagation of *V. corymbosum* "cranberry".

Keywords: Micropropagation, cranberry, 6-benzylaminopurine, indolbutyric acid, Murashige and Skoog.

¹Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Papa y Cultivos Andinos -Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo - Perú

²Facultad Ciencias Biológicas – Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo - Perú

INTRODUCCIÓN

El arándano, es un frutal nativo de Norteamérica que pertenece a la familia Ericaceae, abarca entre 400 y 500 especies distribuidas desde el Asia hasta Los Andes. El arándano se caracteriza por ser un arbusto erecto, con altura variable según la especie (0,3 a 7,0 m), de hojas alternas, caducas o perennes y de gran longevidad. El 35% de las especies son nativas de América correspondiendo el 25% a Norteamérica y 10% a Centro y Sudamérica. De todas las especies, *V. corymbosum* es la más cultivada y comercializada en el mundo, por la gran demanda que presenta debido a su sabor y a las propiedades antioxidantes que presenta (Reque, 2014; Brenes, 2015). El fruto es una baya esférica de 0.7 cm a 1.5 cm de diámetro, los cuales, se caracterizan por su valor nutritivo, contenido de fibra, elevado aporte de potasio, contenido de vitamina A y C, bajo nivel calórico y actividad antioxidante. Esta última característica proviene de su alta concentración en antocianinas y proantocianidinas (Prior *et al.*, 1998; Ehlenfeldt & Prior, 2001; Sellapan *et al.*, 2002; Zheng & Wang, 2003). Se le cataloga como cultivo nutraceutico, debido a que el consumo de sus frutos contribuye con disminuir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, inhibe el crecimiento de células cancerosas, así como previene enfermedades neurodegenerativas (Heinonen *et al.*, 1998; Seeram, 2008),

por estos motivos se ha convertido en uno de los frutos con mayor demanda en la actualidad y una especie de gran interés económico y medicinal.

Se conoce que propagación por semilla botánica conllevaría a problemas económicos y fitosanitarios, por lo cual es necesario implementar estrategias de innovación, tales como el cultivo *in vitro* (Bhojwani & Dantu, 2013; Castañeda *et al.*, 2014; López *et al.*, 2008). La biotecnología vegetal garantiza mayor multiplicación clonal, sanidad vegetal, estabilidad genética y uniformidad en cuanto a crecimiento y producción en una gran gama de cultivos (Suarez & Quintero, 2014; Vázquez *et al.*, 2014; Oviedo *et al.*, 2015). La micropropagación vegetativa de arándanos, ha contribuido con la expansión del cultivo por todo el mundo (Hinrichsen *et al.*, 2009). Uno de los aspectos de gran importancia y de los cuales depende el éxito de la micropropagación, es el medio de cultivo, ya que cada especie necesita determinadas características nutritivas para su óptimo desarrollo. Existiendo una gran diversidad de medios de cultivo, los cuales constan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento (Murashige & Skoog, 1962).

Los reguladores del crecimiento son útiles para el establecimiento y crecimiento de los cultivos de tejidos vegetales (Kucera *et al.*, 2005). Dentro de este grupo de

reguladores de crecimiento están las citoquininas y auxinas. Las citoquininas provocan la división celular y el retraso de la senescencia junto con la estimulación del desarrollo de las yemas laterales, mientras que las auxinas son reguladores del crecimiento que promueven el alargamiento y división celular (Kende & Zeevaart, 1997). Ante la necesidad de un mayor conocimiento en esta área, se propuso como objetivo de investigación determinar la concentración óptima de la 6-bencilaminopurina (BAP) en medio Murashige y Skoog, 1962.

MATERIALES Y MÉTODOS

Adquisición y registro del material biológico:

Las plantas de *V. corymbosum* “arándano” fueron adquiridas del Proyecto Especial Chavimochic, Campamento San José (Virú, La Libertad, Perú). Las cuales fueron transportadas al invernadero del Laboratorio de Biotecnología del Instituto de la Papa y Cultivos Andinos. Una rama florífera fue llevada al Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo, para su identificación y registro, donde se le asignó el código N° 59726.

Preparación del medio de cultivo MS (1962):

Para la preparación de 150 ml de medio de cultivo se emplearon 15 mL de solución de MS (1962), 4.5 gramos de sacarosa, 1.2 gramos de agar y agua destilada en cantidades suficientes. Se dispensó el medio de cultivo en 90 frascos

de penicilina, considerando cinco tratamientos con diferentes concentraciones del 6-bencilaminopurina (BAP): T1 (0 ppm), T2 (8 ppm), T3 (10 ppm), T4 (12 ppm) y T5 (15 ppm) (figura 1). Finalmente el medio de cultivo preparado fue autoclavado para su posterior uso en la fase de establecimiento *in vitro*.

Establecimiento *in vitro* de *V. corymbosum*:

Las plantas madres fueron tratadas 24 horas antes de la escisión de los entrenudos con una solución del fungicida “Benlate” 1 g/L. Los entrenudos de 1.5 cm de largo fueron cortados y llevados a la cámara de flujo laminar donde se desarrolló el protocolo de desinfección, empleando alcohol de 70° por un lapso de 30 segundos y lejía al 2% por 2 minutos. En todos los casos después de cada desinfección, los entrenudos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se introdujeron directamente en el medio de cultivo previamente autoclavado; Luego fueron transportados al cuarto de incubación a una temperatura de 32.5°C, humedad relativa de 64.3% y fotoperiodo de 16/8. La evaluación de la contaminación se realizó una vez por semana durante 4 semanas. Transcurrido este tiempo, se realizó la evaluación periódica de los explantes hasta obtener un aproximado de 40 unidades muestrales, tomando como parámetros de evaluación: número de hojas y longitud del tallo por explante.

Diseño experimental y análisis estadístico
Se aplicó el diseño experimental completamente al azar, con la técnica de asignación al azar. Se usaron cinco tratamientos y 18 unidades muestrales por tratamiento en la fase de establecimiento *in vitro*. Para la fase de enraizamiento *ex vitro* se consideró tres tratamientos y

cinco unidades muestrales por tratamiento. Se aplicó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de los promedios de Tukey, con un alfa de 0.05, empleando el programa InfoStat versión 2018.

Tabla 1. Cantidad de Medio de cultivo MS y BAP (50 ppm) en mililitros empleada para la fase de establecimiento *in vitro* de acuerdo a los tratamientos establecidos.

Componentes	T1 (0 ppm)	T2 (8 ppm)	T3 (10 ppm)	T4 (12 ppm)	T5 (15 ppm)
Medio de cultivo MS (mL)	27	22.7	21.6	20.5	18.9
BAP 50 ppm (mL)	0	4.3	5.4	6.5	8.1

RESULTADOS

En las figuras 1 y 2 se observa el efecto de la concentración del 6-bencilaminopurina (T1, T2, T3, T4, T5) en la longitud de tallo y número de hojas de *V. corymbosum* a los 34 días del establecimiento *in vitro* en medio MS (1962), respectivamente, obteniendo mejores resultados en los tratamientos que presentaron concentración de BAP. Las tablas 3 y 4 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto del 6-bencilaminopurina, a diferentes concentraciones (T1, T2, T3, T4, T5), en

la longitud de tallo y número de hojas, existiendo diferencias significativas entre los tratamientos para ambas variables.

Por otro lado las tablas 5 y 6 se muestra la Prueba de Comparaciones Múltiples Tukey para determinar el efecto del 6-bencilaminopurina a diferentes concentraciones (T1, T2, T3, T4, T5), en la longitud del tallo y número de hojas de *V. corymbosum*, durante el establecimiento *in vitro* en medio MS (1962) respectivamente, obteniendo mejores resultados a 15 ppm (T5).

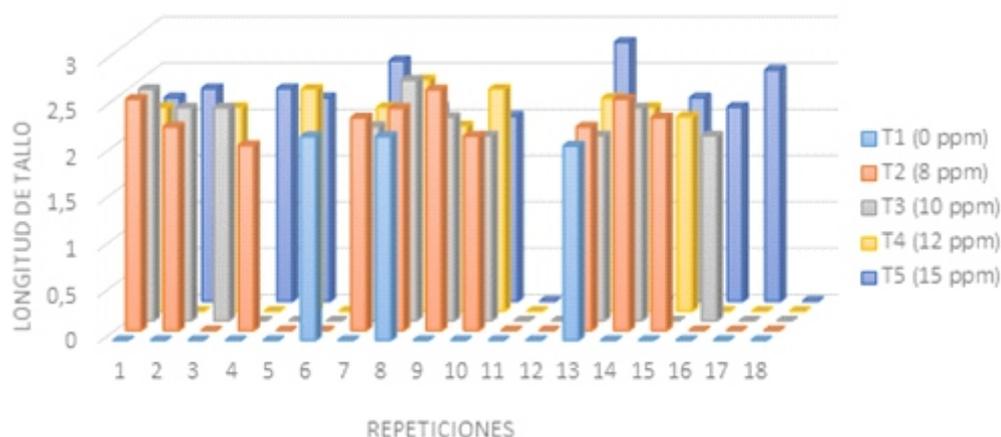


Figura 1. Efecto de la concentración del 6-bencilaminopurina (T1, T2, T3, T4, T5) en la longitud de tallo de *V. corymbosum* a los 34 días del establecimiento *in vitro* en medio MS (1962).

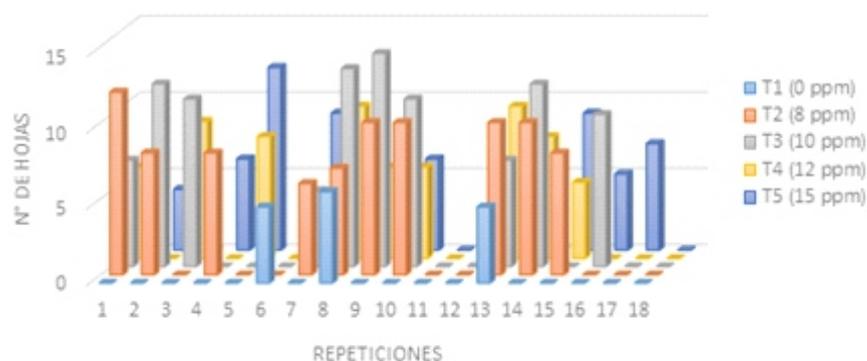


Figura 2. Efecto de la concentración del 6-bencilaminopurina (T1, T2, T3, T4, T5) en el número de hojas de *V. corymbosum* a los 34 días del establecimiento *in vitro* en medio MS (1962).

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto del 6-bencilaminopurina, a diferentes concentraciones (T1, T2, T3, T4, T5), en la longitud de tallo de *V. corymbosum* durante el establecimiento *in vitro* en medio MS (1962).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12.86	4	3.21	2.62	0.0403
Tratamiento	12.86	4	3.21	2.62	0.0403
Error	104.1	85	1.23		
Total	117.06	89			

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto del 6- bencilaminopurina, a diferentes concentraciones (T1, T2, T3, T4, T5), en el número de hojas de *V. corymbosum* durante el establecimiento *in vitro* en medio MS (1962).

F.V.	SC	gl	CM	F	p- valor
Modelo	240.38	4	60.09	3.36	0.0132
Tratamiento	240.38	4	60.09	3.36	0.0132
Error	1529.22	85	17.87		
Total	1759.60	89			

Tabla 5. Prueba de comparaciones múltiples Tukey para determinar el efecto del 6- bencilaminopurina a diferentes concentraciones (T1, T2, T3, T4, T5), en la longitud del tallo de *V. corymbosum* durante el establecimiento *in vitro* en medio MS (1962).

Tratamiento	Medias	n	E.E		
T1	0.36	18	0.26	A	
T3	1.24	18	0.26	A	B
T4	1.25	18	0.26	A	B
T2	1.28	18	0.26	A	B
T5	1.41	18	0.26		B

Ttabla 6. Prueba de comparaciones múltiples Tukey para determinar el efecto del 6- bencilaminopurina a diferentes concentraciones (T1, T2, T3, T4, T5), en el número de hojas de *V. corymbosum* durante el establecimiento *in vitro* en medio MS (1962).

Tratamiento	Medias	n	E.E		
T1	0.89	18	1.00	A	
T4	4.00	18	1.00	A	B
T5	4.17	18	1.00	A	B
T2	4.94	18	1.00		B
T3	5.67	18	1.00		B



Figura 3. Efecto del 6- bencilamimopurina en los tratamientos (T1, T2) pertenecientes a la fase de establecimiento *in vitro* de *V. corymbosum* a los 34 días.

DISCUSIÓN

El mejor desarrollo de los explantes utilizando el medio Murashige & Skoog (MS) 1962 se debió a su alta concentración en iones amonio NH_4^+ (20.6 mM), iones nitrato NO_3^- (39.4 mM), iones cloro Cl^- (6.0 mM) y MoO_4^- (1.0 mM), además de concentraciones relativamente bajas de Ca , PO_4^- , Mg^+ y Cu^{++} siendo confirmado por estudios de Cassells & Curry (2001); A diferencia del medio de cultivo WPM que es un medio de baja concentración en sales (Lloyd & McCown, 1981).

Por otro lado las diferencias significativas entre los tratamientos para las variables longitud de tallo ($0.0403 < p$) y número de hojas ($0.0132 < p$) demostradas mediante el análisis de varianza (Tablas 3 y 4) demuestran la influencia del efecto del 6-Bencilaminopurina a diferentes concentraciones. Siendo el mejor resultado, T5 a 15 ppm, comprobado mediante la Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Probablemente se deba a que las

citoquininas juegan un papel relevante en el cultivo de tejidos vegetales, especialmente en la inducción de la división celular y el control de la morfogénesis (Taiz & Zeiger, 2008; Ruzic *et al.*, 2012). Investigaciones sostienen que el BAP es sustancial para la elongación de explantes, logrando optimizar el medio de cultivo. Sin embargo concentraciones elevadas favorecen la excesiva desdiferenciación y formación de los callos celulares. El bajo rendimiento del T1 (tablas 3 y 4) debido a la ausencia del BAP, con un menor desarrollo de brotes, indica que no solo la composición del medio de cultivo afecta el desarrollo de yemas, sino que además, tanto el tipo de citoquinina, como la concentración, interactúan afectando de manera directa la inducción de crecimiento y desarrollo de yemas axilares en explantes de *Vaccinium*, demostrando así que el T1 al tener 0 ppm del BAP, no estimuló la proliferación celular a nivel de los brotes (George *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

Se concluye que el BAP a la concentración de 15 ppm es el más óptimo para la micropropagación *in vitro* de *V. corymbosum* "arándano".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bhojwani S. and Dantu P. K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer. New Delhi, India. 309 p.
- Brenes A., Castillo R., Gómez L. (2015). Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (*Vaccinium spp.*) a partir de segmentos foliares de dos procedencias. *Agronomía Costarricense* 39(1): 7-23.
- Castañeda-Castro O., Gómez-Merino F. C., Trejo-Téllez L. I., Morales-Ramos V., González-Arno M. T., Martínez-Ocampo Y. M., Gámez-Pastrana R. y Pastelín-Solano M. C. (2014). Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar (*Saccharum spp.*). *Agroproductividad* 7,16-21.
- Cassells A. and Curry R. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 64,145-157.
- Ehlenfeldt M. K. and Prior R. L. (2001). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2222-2227.
- George E., Hall M. A. and De Klerk G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3a ed., Vol. 1). The Netherlands: Springer. 29-64 p.
- Heinonen I.M., Meyer A.S. and Frankel E.N. (1998). Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4107-4112.
- Hinrichsen P., Castro M., Ravest G., Rojas G., Méndez M., Bassil N. & Muñoz C. (2009). Minimal Microsatellite Marker Panel for Fingerprinting Blueberry Cultivars. *Acta Hort.*, 810,173-180.
- Kende H., & Zeevaart J.A.D. (1997). The five "classical" plant hormones. *Plant Cell.*, 9,1197-1210.
- Kucera B., Cohn M.A. and Leubner-Metzger G. (2005). "Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination". *Seed Sci. Res.*, 15(4): 281-307. doi:10.1079/SSR2005218.
- López-Estrada M. E., Acosta-Rodríguez M. C., Otero-Colina G., Michel-Aceves A. C. y Noriega-Cantú D. H. (2008) Manejo de plántulas de mango (*Mangifera indica* L.) obtenidas *in vitro* para estudios de sanidad vegetal. *Revista Mexicana*

- de Fitopatología*, 26(2), 184-187.
- Lloyd G. and McCown B. (1981). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators Society*, 30, 421-427.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Oviedo D., Alvarenga S., Evangelista S., Sepúlveda G., and Rodríguez M. (2015). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un Cultivo Promisorio para México. *BioTecnología*, 19(2), 14-27.
- Prior R. L., Cao G., Martin A., Sofic E., McEwen J., Brien C., et al. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7): 2686–2693. doi:10.1021/jf980145d.
- Reque P., Steffens R., Martins da Silva A., Jablonski A., Flôres S., Rios A., Vogt de Jong E. Characterization of blueberry fruits (*Vaccinium* spp.) and derived products. (2014). *Food Sci. Technol*, Campinas 34(4): 773-779.
- Ruzic D., Vujovic T., Libiakova G., Cerovic R. and Gajdosova A. (2012). Micropropagation in vitro of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Berry Research*, 2:97-103. doi:10.3233/JBR-2012-030.
- Sellapan S., Akoh C., Krewer G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2432–2438.
- Seeram N.P. (2008). Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3):630-635. doi:10.1021/jf072504.
- Suarez I. & Quintero I. (2014). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un endulzante natural a través de explantes con meristemos pre-existentes. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 16(1), 29-33.
- Taiz L. and Zeiger E. (2008). *Plant Physiology* (4a Edición). Artmed, Porto Alegre, 819 p.
- Vázquez L., Robledo A., Muratalla A. and Conde V. (2014). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni y detección de steviósidos. *Bioagro*, 26(1), 49-56.
- Zheng W. and Wang S. Y. (2003). Oxygen radical absorbing capacity of flavonoids and phenolic acids in blueberries, cranberries and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2): 502–509. doi: 10.1021/jf020

CORRESPONDENCIA

Dr. Eloy López Medina
slopezm@unitru.edu.pe