

MICROPROPAGACIÓN DE CUATRO CULTIVARES DE ARÁNDANO (*Vaccinium* spp.) A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE DOS PROCEDENCIAS

Arturo Brenes Angulo¹*, Rolbin Castillo Matamoros*, Luis Gómez-Alpízar*

Palabras clave: Cultivo de tejidos; reguladores de crecimiento; TDZ; AIB; Zeatina; aclimatización.
Keywords: Tissue culture; plant growth regulators; TDZ; zeatine; IBA; acclimatization.

Recibido: 11/08/14

Aceptado: 27/11/14

RESUMEN

Los cultivares de arándano Sharpblue, Woodard, Bonita y Delite se propagaron a partir de secciones de hoja procedentes de explantes uninodales establecidos in vitro y de secciones de hoja directamente del campo. Los explantes se colocaron en medio WPM suplementado con 1,5 mg.l⁻¹ de TDZ para promover la brotación; luego se subcultivaron a medio fresco WPM suplementado con 0,5 ó 1,0 mg.l⁻¹ de Zeatina, para promover el crecimiento de los brotes. Se determinó la longitud de la micromacolla y el número de brotes >2mm y >1cm por micromacolla. Brotes de 8-10 cm se cosecharon a las 8 semanas y se subcultivaron en WPM suplementado con 0, 1, 2, 4 u 8 mg.l⁻¹ de AIB, para promover su enraizamiento; a las 10 semanas se trasplantaron a invernadero para aclimatización. Al cultivar los segmentos foliares en WPM con 1,5 mg.l⁻¹ de TDZ se formaron micromacollas en todas las variedades, independientemente de la procedencia de la hoja, con un efecto significativo del cultivar, la procedencia, del explante y la interacción cultivar x procedencia, para el número de brotes >2 mm obtenidos. El tamaño de la micromacolla varió significativamente según cultivares, procedencia del explante e interacción

ABSTRACT

Micropropagation of four blueberry cultivars. Sharpblue, Woodard, Bonita and Delite cultivars were propagated from leaf explants. Leaf sections from in vitro single-node explants were compared with those from plants in the field. The explants were placed in WPM medium supplemented with 1.5 mg.l⁻¹ TDZ to promote sprouting, then subcultured to fresh WPM medium supplemented with 0.5 or 1.0 mg.l⁻¹ zeatin to enhance adventitious shoot growth. Shoot clump length and number of shoots >2mm and >1cm in each clump were determined. Shoots 8 to 10 cm were harvested at 8 weeks and subcultured in WPM medium supplemented with 0, 1, 2, 4 or 8 mg.l⁻¹ IBA for rooting. After 10 weeks, shoots were transplanted to greenhouse for acclimatization. The leaf segments cultured in WPM medium with TDZ formed adventitious shoot clumps in all varieties, regardless of leaf source. A significant effect of cultivar, source of explant and interaction cultivar x leaf source was found for shoots >2 mm. Clump size varied significantly among cultivars, leaf source, and interaction cultivars x source x zeatin concentration, when transferring to a medium with 2 concentrations of the growth regulator, but no

1 Autor para correspondencia. Correo electrónico: arturo.brenes@ucr.ac.cr

* Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica.

cultivares x procedencia x concentración de zeatina, al trasferirse a un medio con 2 concentraciones del regulador de crecimiento, pero no hubo diferencias con respecto a éstas. El número de brotes > 2mm y la longitud del más largo variaron significativamente con el cultivar, y la interacción cultivar x procedencia del explante en WPM con 0,5 mg.l⁻¹ de Zeatina. Explantes de Woodard a partir de vitrohoja produjeron el mayor número de brotes (44,70±13,34) y Delite de vitrohoja el menor (21,50±4,99). Los brotes subcultivados en WPM con diferentes concentraciones de AIB mostraron enraizamiento menor al 10% en todos los tratamientos. Sin embargo, al trasplantarse a invernadero se obtuvo 100% de enraizamiento, independientemente del tratamiento in vitro con AIB o la procedencia del explante. Todas las plántulas de los 4 cultivares se desarrollaron bien en invernadero y posteriormente en el campo.

INTRODUCCIÓN

Los arándanos conocidos en inglés como blueberries, son plantas arbustivas del género *Vaccinium*, familia Ericaceae (Syn. Heath). El género contiene entre 450 y 500 especies con una amplia distribución geográfica en el hemisferio norte. Aproximadamente el 35% de las especies son originarias de América, 25% de Norte América y 10% de Centro y Sur América (Song y Hancock 2011).

La producción comercial de arándanos se basa mayormente en especies del subgénero *Cynacoccus*: variedades o cultivares de *V. corymbosum* L. (highbush) y de *V. ashei* Reade (rabbiteye u ojo de conejo) y rodales naturales de *V. angustifolium* (lowbush). Las variedades o cultivares tipo “Highbush” se dividen con base en su requerimiento de horas frío en 2 tipos: norte (>700 horas frío) y sur (< 400 horas frío) (Song y Hancock 2011, Finn et ál. 2014).

Entre el 2000 y el 2010, el área cultivada de arándanos aumentó globalmente en un 275%,

differences due to cytokinin concentration were found. Number of shoots >2mm and length of the longest shoot varied significantly with cultivar and the interaction cultivar x source of explant in WPM + zeatin medium. Woodard explants from in vitro leaf sections produced the highest number of shoots (44.70±13.34) and Delite the lowest (21.50±4.99). Shoots subcultured in WPM with different IBA concentrations had less than 10% rooting in all treatments. However, when transplanted to greenhouse 100% rooting was obtained, regardless of in vitro treatment with IBA or leaf explant source. All the microshoots of the 4 cultivars were successfully greenhouse acclimatized and plantlets later established in the field.

e incluyó tanto áreas tradicionales como no tradicionales de cultivo (Bañados 2006, Finn et ál. 2014). En América Latina, Chile, Argentina, Uruguay y México han experimentado un fuerte auge en la producción de arándanos (Bañados 2006). Un aspecto interesante a puntualizar es que el mayor aumento en el área de cultivo no ha ocurrido en los países de mayor consumo, lo que implica por un lado que el consumo local es bajo y podría aumentar y por otro, que es un cultivo de exportación (Bañados 2006, Finn et ál. 2014).

Uno de los factores asociados a este dramático incremento es la demanda de la fruta por parte de los consumidores con base en su valor nutricional y sus beneficios en la salud humana (Howell 2009, Finn et ál. 2014). Los frutos de arándano poseen un alto contenido de antocianinas, proantocianidinas y otros flavonoides (Kalt et ál. 1999) que, solos o en conjunto, tienen diferentes efectos terapéuticos: antiúlcera, antitumorales, antiinflamatorios y antioxidantes (Cristoni y Magistretti 1987, Kamei et ál. 1995,

Wang et ál. 2012, Howell 2009, Lila et ál. 2014), y han sido incluso denominados “súper frutos” (Howell 2009, van Kooten y Brouns 2014). Se estima que su demanda continuará en aumento en los próximos años. La expansión del cultivo de arándanos a zonas no tradicionales de producción también está asociada a la obtención de nuevos cultivares tipo “highbush” con bajos requerimientos de frío (Prodorutti et ál. 2007, Bañados 2006, Finn et ál. 2014).

Costa Rica posee condiciones naturales propicias para el cultivo y producción de arándanos. En la Sub-estación Experimental Fraijanes, de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno de la Universidad de Costa Rica, ubicada en Fraijanes, Poás, Alajuela, hace 20 años se introdujo una colección de 7 cultivares de arándanos, provenientes del Banco Nacional de Germoplasma Clonal del USDA, Corvallis, Oregon, Estados Unidos de América (Hine y Abdelnour 2013). Dos cultivares tipo “highbush” (Avonblue y Sharpblue) y 5 tipo ojo de conejo o “rabbiteye” (Alicebblue, Beckyblue, Bonita, Delite y Woodard). Los cultivares Alicebblue, Avonblue y Beckyblue se perdieron. Los cultivares restantes han mostrado un buen desarrollo y una excelente calidad de fruto, particularmente el Sharpblue. En adición, en el país existen alrededor de 10 especies silvestres de *Vaccinium*, con potencial comercial (Madriz 1999), de manera que es un cultivo promisorio para la diversificación agrícola del país.

La evaluación de nuevos cultivares en diferentes zonas de producción, así como su promoción para cultivo comercial, requiere la disponibilidad de semilla en cantidades suficientes, genéticamente uniforme (pureza varietal) y libre de plagas y enfermedades. Los arándanos se propagan comercialmente en forma vegetativa, mediante el enraizamiento de estacas de tallo herbáceas o leñosas. Sin embargo, esta práctica es lenta, hay genotipos que presentan bajos porcentajes de enraizamiento y puede contribuir a la diseminación de enfermedades (González et ál. 2000, Ostrolucká et ál. 2004, Meiners et ál. 2007, Trevisan et ál. 2008, Fischer et ál. 2012).

En las últimas 3 décadas, la propagación vegetativa de arándanos mediante cultivo de tejidos o micropropagación, ha contribuido a la expansión del cultivo (Debnath 2007, Prodorutti et ál. 2007, Hinrichsen et ál. 2009, Tetsumura et ál. 2008). Este tipo de propagación permite obtener una gran cantidad de plantas en menor tiempo y libres de agentes patógenos como virus, hongos y otros (González et ál. 2000, Prodorutti et ál. 2007). En adición, se ha demostrado que las plantas de arándano derivadas de cultivo de tejidos, en comparación con su contraparte, propagada mediante estacas de tallo, tienen un hábito de crecimiento más tupido, con mayor brotación lateral, desarrollo de corona y cantidad de yemas florales por planta, lo que se traduce en mayor cantidad de frutos y rendimiento, aunque pueden existir diferencias entre cultivares (Morrison et ál. 2000, Litwin'czuk et ál. 2005, Debnath et ál. 2012, Marino et ál. 2014). Otra ventaja que presenta la micropropagación es su utilización en variedades que son difíciles de enraizar convencionalmente. Por otra parte, las plantas micropropagadas corresponden al tipo original y no se han detectado variantes somaclonales (Gajdošová et ál. 2006, Prodorutti et ál. 2007, Debnath 2011). Sin embargo, los protocolos de micropropagación por cultivar son específicos y no es posible su generalización (Reed y Abdelnour 1991, Li et ál. 2006, Liu et ál. 2010, Tetsumura et ál. 2008).

El establecimiento y multiplicación in vitro de un cultivar depende de factores como las condiciones de cultivo, el tipo de explante y el medio utilizado (Jiang et ál. 2009, Liu et ál. 2010, Tetsumura et ál. 2008). Por otra parte, la utilización de explantes de árboles adultos presenta inconvenientes, entre ellos la contaminación y una baja respuesta morfogénica (Castro y Álvarez 2013).

En Costa Rica, Hine y Abdelnour (2013) evaluaron el establecimiento in vitro de arándano, variedad Avonblue, a partir de estacas maduras e inmaduras de plantas adultas en medio de Murashige y Skoog (1962). Al utilizar estacas maduras se observó una alta contaminación, entre un 85 y 98%, según el método de desinfección.

Para la estacas inmaduras se obtuvo un 75% de explantes limpios, cuando se utilizó hipoclorito de sodio al 1,5% (v/v) por 40 minutos. Las estacas inmaduras de arándano fueron inducidas a la brotación en el medio de cultivo Lloyd y McCown (1981) (WPM, *Woody Plant Medium*), complementado con 2,5 mg.l⁻¹ de 3 diferentes citocininas (2iP, BAP y CPPU), en forma independiente. Aunque los segmentos nodales de las estacas inmaduras brotaron, el número de brotes no fue superior a 2 y su mayor longitud fue de 2 cm. Los autores no informan sobre subcultivos o tasas de multiplicación.

El objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo de micropropagación para 4 variedades de arándano a partir de hojas provenientes de plantas adultas establecidas en el campo y de hojas de segmentos nodales establecidos in vitro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fuente de material

Los propágulos (tallos jóvenes de 25 a 30 cm de longitud y hojas) se obtuvieron de plantas adultas de los cultivares Bonita, Delite, Sharpblue y Woodard, con más de 20 años de establecidas en la Subestación Experimental Fraijanes de la Universidad de Costa Rica, ubicada en Poás, Alajuela, Costa Rica. Los cultivares Bonita, Delite y Woodard corresponden al tipo ojo de conejo o “rabbiteye” (*V. ashei* Reade) y el cultivar Sharpblue al tipo “Southern highbush” (*V. corymbosum* L.).

Establecimiento in vitro de segmentos nodales

A los tallos se les eliminó las hojas y se seccionaron en segmentos nodales de 5 cm de longitud con 2 yemas axilares cada uno y se sometieron al siguiente procedimiento de desinfección superficial: 30 min en agua corriendo, inmersión en alcohol de 70% en agitación constante durante 1 min, seguido por inmersión en una solución NaOCl al 3% (v/v) con una gota de Tween 20, y agitación durante 10 min. Luego, en una cámara de flujo laminar, se realizaron

3 enjuagues consecutivos con agua desionizada estéril durante 2 min cada uno. Finalmente, se cortaron los extremos de cada segmento nodal hasta obtener 2 explantes de aproximadamente 1 cm con una sola yema axilar cada uno.

Cada segmento nodal se cultivó en posición vertical y con polaridad positiva en tubos de ensayo de 25 mm de diámetro con 10 ml de medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) suplementado con 2,0 mg.l⁻¹ de N6– Bencilaminopurina (BAP), 3 g.l⁻¹ de sacarosa y 2 g.l⁻¹ de phytigel. Se utilizaron 50 segmentos nodales por cultivar. A los 8 días de cultivo se determinó el número y porcentaje de explantes contaminados por bacterias y hongos, explantes necrosados (oxidación) y explantes vivos. Los explantes sobrevivientes se subcultivaron cada 15 días en medio fresco con la misma composición durante 8 semanas.

Multiplicación in vitro a partir de hojas

Se utilizaron hojas provenientes de las plantas adultas (campo) y las hojas producidas in vitro a partir de los segmentos nodales (vitrohojas) de cada cultivar. Las hojas de plantas adultas de campo se recolectaron del tercio superior de tallos jóvenes y se desinfectaron según el protocolo descrito para los segmentos nodales.

A partir de las hojas de ambas procedencias (campo e in vitro) se utilizó como explante, segmentos de aproximadamente 1,5 cm². Estas se cortaron transversalmente y los segmentos se colocaron con la superficie abaxial en contacto con el medio. El cultivo se realizó en frascos tipo “colado para bebé” de 125 ml con 25 ml de medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd y McCown 1981) suplementado con 1,5 mg.l⁻¹ de tiazurón (TDZ), 30 g.l⁻¹ de sacarosa y 8 g.l⁻¹ agar. El pH de todos los medios de cultivo utilizados se ajustó a 6,0 con KOH y/o HCl y estos se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1,2 kg/cm² de presión (20 psi) durante 20 minutos. Los explantes fueron incubados en un cuarto de crecimiento con una temperatura de 23±2°C, y un fotoperíodo de 16 h, provisto por lámparas fluorescentes “cool-white”, con una intensidad lumínica de 58 μmolm⁻²s⁻¹. Para las hojas provenientes de

campo se empleó un número variable de secciones foliares (explantos) por variedad (Sharpblue, 81; Woodard, 145; Delite, 97 y Bonita 163). A la semana de cultivo se determinó el número y porcentaje de secciones foliares vivas, contaminadas (bacterias y hongos) y oxidadas. Para las hojas provenientes de *in vitro*, se utilizó 5 explantes por frasco y 10 frascos por variedad, para un total de 50 explantes.

A las 8 semanas de cultivo se determinó, para ambas procedencias, el porcentaje de: explantes foliares con respuesta (protuberancias y brotes adventicios), explantes con micromacolla (grupos de brotes), micromacollas con brotes de una longitud mayor a 2 mm (>2 mm); y número de brotes >2 mm por micromacolla.

Luego de 8 semanas, las micromacollas se subcultivaron a medio fresco WPM suplementado con 0,5 mg.l⁻¹ ó 1,0 mg.l⁻¹ de zeatina, para evaluar el efecto de la concentración de zeatina sobre la elongación y multiplicación de los brotes adventicios. Se utilizó un diseño factorial con 10 repeticiones compuestas por 5 unidades experimentales, donde el primer factor correspondió a las 2 procedencias de explante (campo e *in vitro*), el segundo a 4 cultivares y el tercero a 2 citocininas. Se cultivaron 2 micromacollas por frasco (repetición).

A las 8 semanas de cultivo se determinó la longitud de la micromacolla y el número de brotes adventicios con una longitud mayor a 2 mm y a 1 cm. Las micromacollas se subcultivaron nuevamente en el mismo medio fresco colocando 2 micromacollas por frasco y se incubaron 10 frascos por procedencia de hoja y cultivar. Tras otras 8 semanas se midió nuevamente el número de brotes con una longitud mayor a 2 mm y la longitud del brote más largo de cada micromacolla.

Finalmente, las micromacollas se subcultivaron en un medio fresco WPM con 0,5 mg.l⁻¹ zeatina. Dos micromacollas por frasco y 10 frascos por procedencia de hoja y cultivar. A las 8 semanas se determinó nuevamente, la longitud de la micromacolla, el número de brotes con una

longitud mayor a 2 mm y la longitud del brote más largo de cada micromacolla.

Enraizamiento *in vitro* y aclimatización

Brotes o microtallos de 8 cm de longitud, provenientes del medio WPM con 0,5 mg.l⁻¹ de zeatina, se cultivaron en medio WPM con 30 g.l⁻¹ de sacarosa y 8 g.l⁻¹ de agar y concentraciones de 0, 1, 2, 4, y 8 mg.l⁻¹ de ácido 3-indol-butírico (AIB). Se inocularon 4 microtallos por frasco y se prepararon 4 frascos por cultivar y procedencia de la hoja, para un total de 16 brotes por cultivar, procedencia de la hoja y concentración de AIB. A las 8 semanas se evaluó el número de microtallos con raíz y se determinó el porcentaje de enraizamiento.

Luego de 10 semanas de cultivo en el medio con AIB, todos los brotes se sacaron de los frascos, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron con agua corriente y se sembraron en bandejas de germinación con turba y vermiculita y se regaron por nebulización bajo condiciones de invernadero. La frecuencia de riego fue de 4 veces al día durante 1 min cada 2 horas. Después de 3 semanas bajo estas condiciones, se determinó el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas y el porcentaje de enraizamiento. Posteriormente, las plántulas se transfirieron a vasos plásticos (de 260 ml de capacidad) con el mismo sustrato para favorecer su desarrollo y macollamiento. Cuando las plántulas medían aproximadamente 15 cm de altura (aproximadamente 6 meses) se sembraron en la Subestación Experimental Fraijanes de la Universidad de Costa Rica, Poás, Alajuela, Costa Rica, para evaluar su establecimiento en campo.

Análisis de los datos

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). Para los factores que resultaron estadísticamente significativos se realizó una prueba de Tuckey (0,05) como separador de medias. Los datos fueron procesados con el paquete estadístico InfoStat.

RESULTADOS

Establecimiento in vitro de segmentos nodales y secciones de hoja

El número y porcentaje de segmentos nodales establecidos in vitro libres de contaminación y oxidación varió de 9 (18%) para la variedad Sharpblue a 37 (74%) para la variedad Woodard, con una media de 27 (54%) (Cuadro 1, Figura 1a). La principal causa de contaminación fue por hongos, con una media de 17,5% (12 a 20%). La contaminación por bacterias fue baja, 2,5% en promedio. La oxidación fue la principal causa de deterioro de los explantes, con una media

de 26,5% (12 a 56%). Se observó diferencias entre cultivares con respecto a la oxidación de los explantes (Cuadro 1). El cultivar Sharpblue presentó el mayor porcentaje de oxidación (56%) en las 3 introducciones realizadas e incluso este proceso oxidativo se manifestó posteriormente cuando se utilizaron hojas, independientemente si eran de campo o in vitro. Para este cultivar, se logró la regeneración de brotes únicamente a partir de 2 explantes foliares (vitrohojas), los que se multiplicaron posteriormente en un medio WPM con 0,5 mg.l⁻¹ de zeatina, como se describe en los siguientes apartados para los otros cultivares. Sin embargo, debido al tamaño de muestra no se incluyó en los análisis posteriores.

Cuadro 1. Número y porcentaje (entre paréntesis) de segmentos nodales contaminados, oxidados y vivos de las 4 variedades de arándano después de una semana de cultivo in vitro.

Variedad	Número de explantes inoculados	Número de explantes con bacteria	Número de explantes con hongo	Número de explantes oxidados	Número de explantes vivos
Sharpblue	50	3 (6)	10(20)	28(56)	9 (18)
Woodard	50	1 (2)	6(12)	6(12)	37 (74)
Delite	50	1(2)	10(20)	8(16)	31(62)
Bonita	50	0(0)	9(18)	11(22)	30 (60)
Media del porcentaje (%)		2,50	17,50	26,50	54,00

Después de 10 semanas, los segmentos nodales sobrevivientes presentaron solo un brote, producto de la elongación de la yema axilar, con hojas de 1,5 a 2 cm de longitud en número

variable (4-6 hojas); pero sin elongación de los entrenudos o proliferación de brotes, por lo que se evaluó el uso de las hojas producidas como fuente de segmentos foliares como explante (Figura 1a).

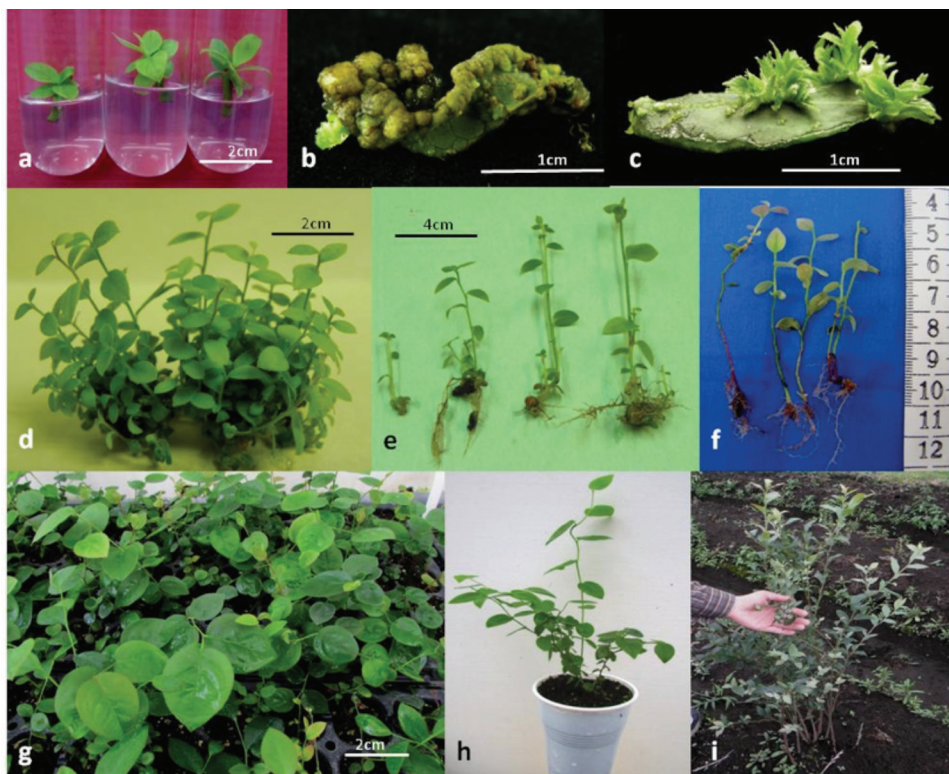


Fig. 1. Morfogénesis en diferentes medios de cultivo de 4 variedades de arándano. (a) Secciones uninodales de 6 semanas en medio MS con 2 mg.l^{-1} de BAP, (b y c) formación de callo y brotes adventicios (micromacolla) en secciones de hoja inoculadas en medio WPM con $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de TDZ. (d) Masa de brotes adventicios en medio WPM con $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de Zeatina. (e) Brotes inoculados en medio WPM con concentraciones de 0, 1, 2, 4 y 8 mg.l^{-1} de AIB. (f) Brotes aclimatizados y enraizados en invernadero, (g) plantas aclimatizadas de 10 semanas de edad, (h) planta de 16 semanas lista para plantarse a campo e (i) planta micropropagada de un año en el campo con frutos.

El Cuadro 2 muestra el porcentaje de contaminación de hongos y bacterias, oxidación y sobrevivencia de las secciones de hojas tomadas de plantas adultas de campo y cultivadas en medio WPM con $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de TDZ. Los porcentajes obtenidos fueron similares a los determinados para los segmentos nodales

(Cuadro 2). El porcentaje de explantes vivos, libres de contaminación y oxidación, varió de 11,1% para la variedad Sharpblue a 79,7% para la variedad Woodard, con una media de 46,5%. La mayor contaminación, 30% en promedio, fue causada por hongos.

Cuadro 2. Número y porcentaje (entre paréntesis) de secciones foliares contaminadas, oxidadas y vivas de las 4 variedades de arándano después de una semana de cultivo in vitro en medio WPM con 0,5 mg.l⁻¹ de TDZ.

Variedad	Número de explantes inoculados	Número de explantes con bacteria	Número de explantes con hongo	Número de explantes oxidados	Número de explantes vivos
Sharpblue	81	3 (3,70)	25 (31)	44 (54,3)	9 (11,1)
Woodard	145	10 (6,9)	53 (36,5)	5 (3,45)	77 (53,1)
Delite	97	2 (2,1)	35 (36,1)	19 (19,6)	41 (42,3)
Bonita	163	1 (0,6)	27 (16,6)	5 (3,1)	130 (79,7)
Media del porcentaje (%)		3,33	30	20,1	46,5

Multiplicación in vitro a partir de hojas

Efecto del cultivar y procedencia del explante foliar sobre la regeneración en medio WPM con 1,5 mg.l⁻¹ de TDZ

Las secciones foliares de ambas procedencias y de todas la variedades, formaron protuberancias y brotes adventicios en un 100%,

luego de 8 semanas de cultivo en medio WPM con 1,5 mg.l⁻¹ de TDZ, a excepción del cultivar Bonita (48%) cuando los explantes procedían del campo (Cuadro 3).

La formación de los brotes en las secciones foliares ocurrió indirectamente, precedida por la formación de callo o abultamiento de la lámina foliar cuando las secciones de hoja se tomaron de plantas de campo (hoja de campo) (Figura 1b), y

Cuadro 3. Efecto del cultivar (C) y procedencia del explante foliar (P) sobre la formación de micromacolla y la brotación en medio WPM con 1,5 mg.l⁻¹ de TDZ. 8 semanas de cultivo.

Cultivar	Procedencia del explante	Explantes con respuesta* (%)	Explantes con micromacolla (%)	Micromacollas con brotes >2mm (%)	Número de brotes >2mm por micromacolla
Woodard	Vitrohoja	100	92,59	57,41	1,16±1,55 bc
	Hoja de campo	100	5,77	5,77	0,15±0,64 a
Delite	Vitrohoja	100	100,00	54,84	1,81±2,06 c
	Hoja de campo	100	81,08	16,22	0,57±1,41 ab
Bonita	Vitrohoja	100	100,00	100,00	7,21±3,27 d
	Hoja de campo	48	19,05	4,76	0,14±0,65 a
Análisis de Varianza SC (tipo III)			P-valor		
Número de brotes >2mm por micromacolla <0,0001		C <0,0001	P <0,0001	I (CxP) <0,0001	

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tuckey.

C=Cultivar, P=Procedencia, I=Interacción *Con protuberancias (callo) y brotes.

directamente cuando las hojas procedían de secciones uninodales cultivadas previamente in vitro (vitrohojas) (Figura 1c). Los brotes adventicios se formaron tanto en los márgenes como en el centro de los explantes.

El porcentaje de explantes que formaron micromacolla (grupo de brotes) fue mayor para hojas in vitro en comparación con hojas de campo en los 3 cultivares. En promedio, el 97,53% de los explantes de las hojas in vitro formó micromacollas, mientras que para hojas de campo fue de 35,30% (Cuadro 3).

El porcentaje de micromacollas con brotes >2 mm siguió una tendencia similar a la anterior, las vitrohojas presentaron un mayor porcentaje de brotes (media =70,75%) que las hojas de campo (media=8,92%) (Cuadro 3).

El cultivar y la procedencia de los segmentos foliares afectaron significativamente el número de brotes por micromacolla con una longitud mayor a 2 mm, luego de 8 semanas de cultivo en medio WPM con 1,5 mg.l⁻¹ de TDZ. En adición, la interacción entre ambos factores para esta variable fue significativa (Cuadro 3). El cultivar Bonita presentó el mayor número de brotes cuando se utilizó explantes provenientes de hojas in vitro (7,21±3,27). Este mismo cultivar mostró el menor número de brotes a partir de secciones foliares de plantas de campo (0,14±0,65), aunque no fue estadísticamente diferente a los cultivares Woodard y Delite para la misma procedencia del explante (hojas de campo). Woodard y Delite tampoco difirieron entre sí en el número de brotes

por micromacolla cuando se utilizaron vitrohojas como explante, con una media de 1,16±1,55 y 1,81±2,06, respectivamente (Cuadro 3).

Efecto del cultivar, procedencia del explante foliar y concentración de zeatina (0,5 y 1,0 mg.l⁻¹) en medio WPM

Los brotes obtenidos en el medio WPM con 1,5 mg.l⁻¹ de TDZ mostraron poca elongación, por lo que se evaluó el efecto de 2 concentraciones de zeatina (0,5 y 1,0 mg.l⁻¹) en el mismo medio WPM, sobre la multiplicación y elongación de los brotes de los cultivares de arándano en estudio.

La longitud de la micromacolla varió significativamente entre cultivares y procedencia del explante foliar (campo e in vitro); pero no entre concentraciones de zeatina. La interacción cultivar x procedencia de explante x concentración de zeatina, I (CxPxCn), no fue significativa (Cuadro 4). Entre cultivares, Delite presentó la micromacolla de mayor longitud (2,90±1,28 cm), estadísticamente similar a Bonita (2,90±1,28 cm), mientras que Woodard, la menor (2,47±0,95 cm). Para la procedencia del explante foliar, la mayor longitud de micromacolla se observó en explantes foliares provenientes de segmentos nodales establecidos in vitro (2,88±1,03 cm) y la menor para los explantes procedentes de plantas adultas de campo (2,59±1,13). La longitud de la micromacolla (Figura 1d.), no difirió significativamente entre las 2 concentraciones de zeatina evaluadas.

Cuadro 4. Efecto del cultivar (C), procedencia del explante foliar (P) y concentración de zeatina (Cn) en medio WPM con 0,5 y 1,0 mg.l⁻¹ de zeatina sobre la longitud de micromacolla en explantes foliares de arándano luego de 8 semanas de cultivo.

Procedencia del explante	Concentración de Zeanita Riboside (mg.l ⁻¹)	Cultivares			Longitud promedio de la micromacolla (cm)
		Woodard	Delite	Bonita	
Hoja de Campo	0,5	2,55±1,02 a	2,84±1,01 bcd	2,32±1,5 ab	2,59±1,13 a
	1,0	2,23±0,8 a	3,12±1,04 de	2,80±1,4 bcd	
Vitro Hoja	0,5	2,58±1,1 ab	3,05±1,07 cde	3,42±0,98 e	2,88±1,03 b
	1,0	2,53± 0,89 ab	2,65±0,9 cd	3,04±1,24 cde	
Longitud promedio de la micromacolla (cm)		2,47±0,95 a	2,92±1,00 b	2,90±1,28 b	
Análisis de varianza SC (tipoIII)				P-valor	
Longitud promedio de la micromacolla (cm)		C	P	Cn	I (CxPxCn)
		<0,0001	0,0026	0,8972	0,1439

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$), según prueba de Tuckey. C=Cultivar, P=Procedencia del explante, Cn=Concentración de Zeatina, I=Interacción.

El cultivar y la procedencia del explante foliar afectaron significativamente el número de brotes >2 mm por micromacolla; no así la concentración de zeatina (Cuadro 5). La interacción entre los 3 factores fue significativa, lo que indica que el número de brotes varió entre la procedencia del explante y la concentración de zeatina y fue dependiente del genotipo. Bonita

produjo el mayor número de brotes en ambas concentraciones de zeatina, cuando se utilizaron segmentos foliares de vitrohojas, 48,51±24,06 y 45,02±24,79 brotes/micromacolla, respectivamente. El menor número de brotes se observó para Woodard en secciones de hojas provenientes de plantas de campo (4,89±3,94 brotes/micromacolla) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto del cultivar (C), procedencia del explante foliar (P) y concentración de zeatina (Cn) en medio WPM sobre la formación de brotes (>2mm) por micromacolla en explantes foliares de arándano luego de 8 semanas de cultivo.

Cultivar	Procedencia del explante foliar	Concentración de Zeatina Riboside (mg.l ⁻¹)	Micromacollas con brotes >2mm (%)	Número de brotes >2mm por micromacolla	
Woodard	Hoja de Campo	0,5	74,03	20,00±13,93 abc	
		1	54,69	4,89±3,94 a	
	Vitro Hoja	0,5	64,81	20,71±18,64 abcd	
		1	79,55	13,71±10,50 ab	
Delite	Hoja de Campo	0,5	94,12	28,31±19,57 defg	
		1	100,00	37,59±23,03 efg	
	Vitro Hoja	0,5	95,83	36,65±26,77 cd	
		1	97,44	28,58±21,15 bccdef	
Bonita	Hoja de Campo	0,5	96,00	32,46±28,34 cdefg	
		1	80,00	44,75±25,47 fg	
	Vitro Hoja	0,5	100,00	48,51±24,06 g	
		1	97,78	45,02±24,79 g	
Análisis de varianza SC (tipoIII)			P-valor		
Número de brotes >2mm por micromacolla		C	P	Cn	I (CxPxCn)
		<0,0001	0,0421	0,3279	0,0139

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$), según prueba de Tuckey. C=Cultivar, P=Procedencia del explante, Cn=Concentración de Zeatina, I=Interacción.

Cuando se evaluó la formación de brotes con una longitud mayor a un centímetro por micromacolla (brotes >1 cm), el cultivar y la concentración de zeatina influyeron significativamente sobre esta variable. La interacción cultivar, procedencia y concentración de zeatina no fue significativa. El cultivar Bonita produjo el mayor número de brotes >1 cm ($9,94 \pm 8,02$) significativamente diferente a Delite ($4,13 \pm 3,51$) y Woodard ($3,18 \pm 2,37$). Entre Delite y Woodard no hubo diferencia significativa (Cuadro 6).

Con base en los resultados anteriores, las micromacollas se subcultivaron a medio fresco WPM con $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de zeatina y luego de 8 semanas se determinó la longitud de la micromacolla, el número de brotes >2 mm y la longitud

promedio del brote más largo (Cuadro 7). La longitud de la micromacolla no difirió entre cultivares ($p=0,1229$) ni procedencia del explante ($p=0,717$). La interacción cultivar x procedencia tampoco fue significativa ($p=0,6140$). El número de brotes >2 mm fue significativamente diferente entre cultivares ($p < 0,0001$) y la interacción cultivar x procedencia de explante afectó significativamente esta variable ($p=0,0025$). Woodard mostró el mayor número de brotes >2 mm a partir de vitrohojas ($44,70 \pm 13,34$), aunque no difirió estadísticamente del número de brotes obtenidos en secciones de hojas de plantas de campo de este mismo cultivar ($35,20 \pm 8,55$) y de Bonita ($38,10 \pm 12,08$) (Cuadro 7). La longitud promedio del brote más largo también varió

Cuadro 6. Efecto del cultivar (C), procedencia del explante foliar (P) y concentración de zeatina (Cn) en medio WPM sobre la formación de brotes (>1cm) por micromacolla en explantes foliares de arándano luego de 8 semanas de cultivo.

Concentración de Zeatina Riboside (mg.l ⁻¹)	Cultivares								
	Procedencia del explante	Woodard		Delite		Bonita		Número de brotes >1cm por micromacolla	
		Número de brotes >1cm por micromacolla	Micromacollas con brotes >1cm (%)	Número de brotes >1cm por micromacolla	Micromacollas con brotes >1cm (%)	Número de brotes >1cm por micromacolla	Micromacollas con brotes >1cm (%)		
0,5	Hoja de Campo	3,86±2,84 ab	36,36	4,78±3,74 ab	67,65	8,50±5,96 abc	72	6,79±5,71 b	
	Vitrohoja	4,52±3,64 ab	42,59	4,95±4,89 ab	39,58	14,13±13,18 c	74,29		
1,0	Hoja de Campo	2,44±1,74 ab	14,06	4,38±3,74 ab	39,02	10,40±6,11 bc	50	4,70±3,56 a	
	Vitrohoja	1,88±1,27 a	38,64	2,40±1,67 ab	12,82	6,71±6,82 abc	75,56		
Número de brotes >1cm por micromacolla		3,18±2,37 a	32,91	4,13±3,51 a	39,77	9,94±8,02 b	67,96		
Análisis de varianza SC (tipoIII)									
Número de brotes >1cm por micromacolla	C	<0,0001		P	0,9718	Cn	0,0574	I (C×P×Cn)	0,2012

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según prueba de Tuckey. C=Cultivar, P=Procedencia del explante, Cn=Concentración, I=Interacción.

Cuadro 7. Efecto del cultivar (C) y procedencia del explante foliar (P) en medio de cultivo WPM con 0,5 mg.l⁻¹ de Zeatina luego de 8 semanas de cultivo.

Cultivar	Procedencia del explante	Longitud promedio de la micromacolla (cm)	Número promedio de brotes >2mm por explante	Longitud promedio del brote más largo (cm)
Woodard	Vitrohoja	3,75±0,35 a	44,70±13,34 c	3,90±1,20 ab
	Hoja de campo	3,50±0,00 a	35,20±8,55 bc	3,55±1,54 ab
Delite	Vitrohoja	3,55±0,50 a	21,50±4,99 a	2,30±0,80 a
	Hoja de campo	3,50±0,33 a	27,40±5,56 ab	3,73±1,27 ab
Bonita	Vitrohoja	3,95±0,44 a	28,30±3,56 ab	4,70±1,09 b
	Hoja de campo	3,65±0,63 a	38,10±12,08 bc	4,60±1,35 b
		P-valor		
Análisis de varianza SC (tipoIII)		C	P	I (CxP)
Longitud promedio de la micromacolla (cm)		0,1229	0,717	0,6140
Número promedio de brotes >2mm por explante		<0,0001	0,3675	0,0025
Longitud promedio del brote más largo (cm)		0,0005	0,3076	0,0542

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$), según prueba de Tuckey. C=Cultivar, P=Procedencia del explante, I=Interacción.

significativamente entre cultivares ($p < 0,0005$); pero no entre procedencia del explante foliar ($p = 0,3076$) o para la interacción de ambos factores ($p = 0,0542$). Bonita presentó la mayor longitud promedio de brotes para ambas procedencias de explante; mientras que la menor fue para Delite cuando el explante fue vitrohoja, aunque no difirió significativamente de la procedencia campo, ni del cultivar Woodard para ambas procedencias de explante (Cuadro 7).

Enraizamiento y aclimatación

Luego de 8 semanas de cultivo en medio WPM con diferentes concentraciones de AIB, los microtallos de todos los cultivares mostraron un porcentaje de enraizamiento inferior al 10%, independientemente de la concentración de AIB. Sin embargo, cuando estos se trasplantaron al sustrato en invernadero, el enraizamiento fue de un 100%, independientemente del tratamiento con AIB o de la procedencia del explante

(Figura 1e y f). Las plántulas de los 4 cultivares de arándano fueron exitosamente aclimatizadas y luego de 16 semanas, establecidas en campo (Figura 1g, h, i).

DISCUSIÓN

El presente trabajo describe un sistema de micropropagación para 4 cultivares de arándano pertenecientes a 2 especies: el cultivar Sharpblue, tipo "highbush" (*V. corymbosum* L.), y cultivares Bonita, Delite y Woodard, tipo "ojo de conejo" (*V. ashei* Reade), a partir de secciones de hoja provenientes de secciones nodales previamente establecidas in vitro y secciones de hoja tomadas de plantas adultas de campo.

En *Vaccinium* y otras plantas leñosas, el establecimiento y crecimiento inicial in vitro de explantes primarios tomados de plantas adultas de campo son limitados, debido principalmente a la alta contaminación, la oxidación y la baja

respuesta de los explantes (Jaakola et ál. 2001, Brissette et ál. 1990, Reed y Abdelnour 1991). En el presente trabajo, el porcentaje de explantes libres de contaminación y oxidación varió de 18% y 11% para Sharpblue a 76% y 80% para Woodard, con una media de 56% y 47% para segmentos nodales y secciones de hoja, respectivamente. El promedio de segmentos nodales sobrevivientes, libres de contaminación y oxidación, es similar o ligeramente superior al obtenido por otros autores (González et ál. 2000, Tetsumura et ál. 2008, Sedlak y Paprstein 2009, Jiang et ál. 2009, Rache y Pacheco 2010, Castro y Álvarez 2013, Hine y Abdelnour 2013).

Los segmentos nodales establecidos in vitro produjeron al inicio únicamente un brote con hojas maduras que no se elongó (Figura 1a), un fenómeno que parece común en la micropropagación de algunos cultivares de arándano, cuando se utilizan explantes provenientes directamente de plantas adultas en campo (Brissette et ál. 1990, Pereira 2009, Jiang et ál. 2009, Hine y Abdelnour 2013). El subcultivo a medio fresco puede promover la elongación de algunos de los brotes; pero no de la mayoría (Brissette et ál. 1990). Por esto se procedió a evaluar el uso de hojas, producidas in vitro o provenientes de plantas de campo, para la micropropagación de los 4 cultivares de arándano en estudio.

Para la micropropagación de arándanos, por lo general se utilizan hojas provenientes de plantas o brotes establecidos previamente in vitro (Cao y Hammerschlag 2000, Li et ál. 2006, Gajdšová et ál. 2006, Meiners et ál. 2007, Liu et ál. 2010). A la fecha, solo Debnath (2009) ha empleado como explante primario hojas provenientes de plantas de invernadero de *V. angustifolium* Ait. Por tanto, a nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se emplean hojas tomadas de plantas de campo para la micropropagación de cultivares de arándano de las especies *V. corymbosum* L. y *V. ashei* Reade.

El procedimiento de micropropagación descrito en el presente trabajo para cultivares de arándano de las especies *V. corymbosum* L. y *V. ashei* Reade, es similar al sistema de “dos pasos”

propuesto por Debnath (2005, 2009) para *V. vitis-idaea* L. y *V. angustifolium* Ait., lo que indica su potencial de uso en otras especies y cultivares del género *Vaccinium*. El primer paso es la obtención de brotes a partir de las secciones de hoja procedentes de plantas in vitro o de campo en un medio de cultivo con TDZ (WPM + 1,5 mg.l⁻¹ de TDZ). El segundo paso consiste en la elongación y multiplicación de los brotes en un medio de cultivo con zeatina (WPM+0,5 mg.l⁻¹ de zeatina). El medio WPM y la citocinina zeatina son utilizados comúnmente en la micropropagación de diferentes variedades de arándano (Zhidong et ál. 2006, Meiners et ál. 2007, Debnath 2009).

Los cultivares difirieron significativamente en su capacidad de regeneración de brotes adventicios y la interacción genotipo x procedencia de explante fue significativa. Esto coincide con lo determinado por diferentes autores quienes indican que las condiciones óptimas para la micropropagación de especies y cultivares del género *Vaccinium* son genotipo-dependientes (Reed y Abdelnour 1991, Li et ál. 2006, Liu et ál. 2010, Tetsumura et ál. 2008). Lo anterior implica la necesidad de optimizar las condiciones para cada especie y/o cultivar. Sin embargo, en la mayoría de las investigaciones, las evaluaciones incluyen las primeras etapas del proceso de micropropagación y aunque la regeneración de brotes a partir de explantes primarios es el primer paso en cualquier protocolo de micropropagación de arándanos, la frecuencia de regeneración inicial no tiene efecto posterior sobre el éxito del programa de micropropagación (Debnath y McRae 2001). Un elevado número de brotes puede obtenerse a partir de los brotes producidos en pocos explantes iniciales limpios (Brissette et ál. 1990, Sedlak y Paprstein 2009), como ocurrió con el cultivar Sharpblue en esta investigación. En adición, conforme aumenta el número de subcultivos, los cultivos se estabilizan y las tasas de multiplicación aumentan (Cuadro 5 y 6). Liu et ál. (2010) determinaron que explantes foliares procedentes de brotes con 5 subcultivos presentan mayor frecuencia de regeneración de brotes que los tomados de cultivos con solo 2 subcultivos.

Los brotes obtenidos a partir de los segmentos foliares tienen un origen adventicio. Por lo general, se favorecen los sistemas de micropropagación que promuevan el crecimiento y proliferación de estructuras preformadas, yemas axilares y ápices, debido a una mayor estabilidad genética de las plantas obtenidas mediante esta vía, en comparación con la adventicia. En el presente estudio no se determinó la uniformidad genética de las plantas obtenidas en relación con las plantas de donde se tomaron los explantes. En arándanos, sin embargo, las plantas micropropagadas mediante la proliferación de brotes adventicios a partir de segmentos foliares han mostrado fidelidad clonal con la planta original, tanto morfológica como molecularmente (Gajdšová et ál. 2006, Debnath 2011, Debnath et ál. 2012).

Los microtallos de los 4 cultivares de arándano mostraron un bajo porcentaje de enraizamiento *in vitro*, menor al 10%; pero un 100% de enraizamiento en invernadero (Figura 1f), independientemente de la concentración de AIB y de la procedencia del explante inicial. Diversos estudios han mostrado que el enraizamiento de brotes micropropagados de arándano ocurre tanto *in vitro* como *ex vitro* (sembrados directamente en invernadero) con o sin la aplicación de AIB (Meiners et ál. 2007, Debnath 2007, Liu et ál. 2010) y depende del genotipo y del medio de multiplicación (Tetsumura et ál. 2008). Tres cultivares tipo highbush (*V. corymbosum*), Berkeley, Bluecrop y Earliblue y el cultivar O'Neal (*V. virginatum*) mostraron un porcentaje de enraizamiento menor cuando se multiplicaron en medio WPM (utilizado en la presente investigación), en comparación con los medios MS y MW, en promedio 45%, 70% y 76%, respectivamente (Tetsumura et ál. 2008). Porcentajes de enraizamiento *ex vitro* entre 80 y 100% para diferentes cultivares de arándano han sido obtenidos por Meiners et ál. (2007) y Liu et ál. (2010), lo que coincide con los resultados del presente estudio. Esto indica que para los 4 cultivares de arándanos evaluados no se requiere una fase de enraizamiento *in vitro* lo que implica un ahorro de recursos. Todas las

plantas micropropagadas sobrevivieron su trasplante a campo.

Costa Rica cuenta con condiciones edafoclimáticas para el cultivo de variedades comerciales de arándano. El método de micropropagación descrito ofrece la oportunidad para producir material de siembra en la cantidad, calidad fitosanitaria, uniformidad genética necesarios y en un corto período para realizar evaluaciones de campo y determinar el verdadero potencial del cultivo de arándanos como una alternativa de producción en el país. En adición, el sistema puede ser aplicado en la reproducción rápida y masiva de las especies locales de *Vaccinium*, tanto para su conservación como para la evaluación de su potencial comercial y en el mejoramiento genético.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria (FITTACORI) de Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica (MAG), por el apoyo económico brindado al inicio de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- BAÑADOS M. 2006. Blueberry Production in South America. *Acta Hort.* 715:165-172.
- BRISSETTE L., TREMBLAY L., LORD D. 1990. Micropropagation of Lowbush Blueberry from Mature Field-grown Plants. *HortScience* 25(3):349-351.
- CAO X., HAMMERSCHLAG F. 2000. Improved Shoot Organogenesis from Leaf Explants of Highbush Blueberry. *HortScience* 35(5):945-947.
- CASTRO D., ÁLVAREZ J. 2013. Micropropagación clonal de tres genotipos mortño, *Vaccinium meridionale* sw., por proliferación de yemas axilares. *Actual Biol.* 35(99):135-144.
- CRISTONI A., MAGISTRETTI M. 1987. Antiulcer and healing activity of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. *Farmaco* 42(2):29-43.
- DEBNATH S. 2005. A Two-step Procedure for Adventitious Shoot Regeneration from *in vitro*-derived Lingonberry Leaves: Shoot Induction with TDZ

- and Shoot Elongation Using Zeatin. *HortScience* 40(1):189-192.
- DEBNATH S. 2007. Strategies to propagate *Vaccinium* nuclear stocks for the Canadian berry industry. *Agriculture, Canadian Journal of Plant Science* 87(4):911-922.
- DEBNATH S. 2009. A two-step procedure for adventitious shoot regeneration on excised leaves of lowbush blueberry. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*. 45:122-128.
- DEBNATH S. 2011. Adventitious shoot regeneration in a bioreactor system and EST-PCR based clonal fidelity in lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *Scientia Horticulturae* 128:124-130.
- DEBNATH S., McRAE K. 2001. In vitro culture of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.): the influence of cytokinins and media types on propagation. *Small Fruits Review* 1:3-19.
- DEBNATH S., VYAS P., GOYALI J., IGAMBERDIEV A. 2012. Morphological and molecular analyses in micropropagated berry plants acclimatized under ex vitro condition. *Can. J. Plant Sci.* 92:1065-1073.
- FINN C., OLMSTEAD J., HANCOCK J., BRAZELTON D. 2014. Welcome to the Party! Blueberry Breeding Mixes Private and Public with Traditional and Molecular to Create a Vibrant New Cocktail. *Acta Hort.* 1017:51-61.
- FISCHER D.L., VIGNOLO G., ALDRIGHI M., FACHINELLO J., ANTUNES L. 2012. Rooting of Blueberry Hardwood Cuttings as Affected by Wood Type. *Acta Hort.* 926:273-278.
- GAJDOŠOVÁ A., OSTROLUCKÁ M., LIBIAKOVÁ G. 2006. Characterization of in vitro obtained clones of selected *Vaccinium* sp., and cultivars using RAPD analysis. *Institute of Plant Genetics and Biotechnology. Slovak Academy of Sciences.* 22 p.
- GONZÁLEZ M., LÓPEZ M., VALDES A., ROJAS R. 2000. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. *Ann. Appl. Biol.* 137:073-078.
- HINE A., ABDELNOUR A. 2013. Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). *Tecnología en Marcha* 26(4):64-71.
- 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.
- HOWELL A. 2009. Update on Health Benefits of Cranberry and Blueberry. *Acta Hort.* 810:779-784.
- JAAKOLA L., TOLVANEN A., LAINE K., HOHTOLA A. 2001. Effect of N6-isopentenyladenine concentration on growth initiation in vitro and rooting of bilberry and lingonberry microshoots. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 66:73-77.
- JIANG Y., HONG Y., DE-QIAO Z., SHAN-AN H., CHUAN-YONG W. 2009. Influences of Media and Cytokinins on Shoot Proliferation of 'Brightwell' and 'Choice' Blueberries In Vitro. *Acta Hort.* 810:581-586.
- KALT W., FORNEY C. MARTIN A., PRIOR R. 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agr. Food Chem.* 47(11):4638-4644.
- KAMEI H., KOJIMA T., HASEGAWA M., KOIDE, T., UMEDA, T., YUKAWA T., TERABE K.1995. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Invest.* 13:590-594.
- LI Y., MA H., ZHANG Z., WU L. 2006. Effect of Cytokinins on In Vitro Leaf Regeneration of Blueberry. *Acta Hort.* 715:417-419.
- LILA M., KELLOGG J., GRACE M., YOUSEF G., KRAFT T., ROGERS R. 2014. Stressed for Success: How the Berry's Wild Origins Result in Multifaceted Health Protections. *Acta Hort.* 1017:23-43.
- LITWIN`CZUK W., SZCZERBA G., WRONA D. 2005. Field performance of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. 'Herbert' propagated by cuttings and tissue culture. *Scientia Horticulturae* 106:162-169.
- LIU C., CALLOW P., ROWLAND L., HANCOCK J., SONG G. 2010. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of southern highbush blueberry cultivars. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 103:137-144.
- LLOYD G., McCOWN B. 1981. Commercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings - Internaticlional Plant Propagator's Society* 30:421-427.
- MADRIZ J. 1999. *Vaccinium: Especies silvestres neotropicales, perspectivas para la domesticación de nuevos frutales arbustivos, en los bosques montanos del neotrópico.* *Memorias IX Congreso Nacional Agronómico.* p. 2.
- MARINO S., WILLIAMSON J., OLMSTEAD J. 2014. Vegetative Growth of Three Southern Highbush Blueberry Cultivars Obtained from micropropagation and Softwood Cuttings in Two Florida Locations. *HortScience* 49(5):556-561.
- MEINERS J., SCHWAB M., SZANKOWSKI I. 2007. Efficient in vitro regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 89:169-176.
- MORRISON S., SMAGULA G., LITTEN W. 2000. Morphology, growth, and rhizome development of *Vaccinium angustifolium* Ait. seedlings, rooted softwood cuttings, and micropropagated plantlets. *HortScience* 4:550-570.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3):473-497.
- OSTROLUCKÁ M., LIBIAKOVÁ G., ONDRUŠKOVÁ E., GAJDOŠOVÁ A. 2004. In vitro propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis, Biology* 676:207-212.

- PEREIRA M. 2009. Reversion to juvenility: the use of epicormics in the micropropagation of mature wild shrubs of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae). *Arquipélago. Life and Marine Sciences* 26:63-68.
- PRODORUTTI D., PERTOT I., GIONGO L., GESSLE C. 2007. Highbush Blueberry: Cultivation, Protection, Breeding and Biotechnology. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 1(1):44-56.
- RACHE L., PACHECO J. 2010. Propagación in vitro de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). *Acta Botanica Brasilica* 24(4):1086-1095.
- REED B., ABDELNOUR A. 1991. The Use of Zeatin to Initiate in Vitro Cultures of *Vaccinium* Species and Cultivars. *HortScience* 26(10):1320-1322.
- SEDLAK J., PAPRSTEIN F. 2009. In Vitro Multiplication of Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Cultivars. *Acta Hort.* 810:575-580.
- SONG G., HANCOCK J. 2011. Basic Botany of *Vaccinium*, pp. 197-221. In: C. Kole (ed.). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Temperate Fruits*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- TETSUMURA T., MATSUMOTO Y., SATO M., HONSHO C., YAMASHITA K., KOMATSU H., UGIMOTO Y., KUNITAKE H. 2008. Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae* 119:72-74.
- TREVISAN R., FRANZON R., NETO R., DA SILVA R., DIAS G., CORRÊA A. 2008. Enraizamento de estacas herbáceas de mirtilo: Influência da lesão na base e do ácido indolbutírico. *Ciênc. Agrotec.* 32:402-406.
- Van KOOTEN O., BROUNS F. 2014. X International Symposium on *Vaccinium* and Other Superfruits. Maastricht, The Netherlands. *Acta Horticulturae* 1017.
- WANG X., LI H., LI W., WU W., HU S. 2012. In vitro Direct Plant Regeneration from Leaves of Blackberry Cultivar 'Boysenberry'. *Acta Hort.* 926:279-285.
- ZHIDONG Z., LIU H., WU L., LI Y. 2006. Technical System of Blueberry Micropropagation in China. *Acta Hort.* 715:421-425



