



Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedades Brigitta y Legacy

Effect of explant density and volume of cultivation medium on *in vitro* multiplication of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) varieties "Brigitta" and "Legacy"

Mario Rodríguez Beraud*, Daniza Morales Ulloa

Escuela de Agronomía, Facultad de Recursos Naturales, Universidad Católica de Temuco, Rudecindo Ortega 02950, Temuco, Chile.

Recibido 17 noviembre 2014. Aceptado 25 enero 2015.

Resumen

El objetivo fue evaluar la multiplicación *in vitro* de dos variedades de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), "Brigitta" y "Legacy", en respuesta a cinco densidades de explantes (5, 10, 15, 20 y 25) y cuatro volúmenes de medio (10, 20, 30 y 40 mL) utilizando para ambas variedades el medio WPM (Woody Plant Medium) en un diseño completamente al azar con 20 tratamientos y 12 repeticiones por tratamiento. Transcurrido 45 días se evaluó: altura de brote, número de brotes/explante, número de nudos/brote y número de brotes/frasco. Brigitta obtuvo la mayor altura del brote en tratamientos con densidades y volúmenes elevados, mientras que Legacy obtuvo el mayor promedio de altura del brote con densidades intermedias y volúmenes elevados. En cuanto al número de brotes/explante, el volumen de medio no influyó en la variedad Brigitta, en cambio, altas densidades la afectaron significativamente, mientras que en Legacy el máximo número de brotes se alcanzó con densidades bajas y volúmenes intermedios. En relación al número de nudos por explante Brigitta obtuvo los valores más bajos comparados con Legacy, pero en ambas variedades se produjo una disminución del número de nudos con menores volúmenes de medio. Para el número de brotes por frasco Brigitta obtuvo las mayores respuestas con densidades elevadas, superando los 40 brotes por frasco. En cambio, en Legacy el resultado máximo se obtuvo con la densidad 25 explantes en 30 mL de medio. Por lo tanto, se concluye que ambas variedades fueron influenciadas tanto por el volumen del medio como la densidad de explantes.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, micropropagación, explantes, brote.

Abstract

The objective of the investigation was to evaluate the *in vitro* multiplication of two varieties of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.), "Brigitta" and "Legacy" in response to five explants densities (5, 10, 15, 20 and 25) and four flask volumes (10, 20, 30 and 40 mL) for cultivation. For both varieties the cultivation medium WPM (Woody Plant Medium) was used. The experiment was completely randomized with 20 treatments and 12 repetitions per treatment. After 45 days of cultivation we evaluated the height of shoots, number of shoots/explant, number of nodes/shoot and number of shoots/flask. Variety "Brigitta" had highest shoots at higher densities and flask volumes, while variety "Legacy" had the highest average shoot height with intermediate densities and high volumes. Regarding the number of shoots/explant, the volume of the medium had no influence on "Brigitta", however, higher plant densities affected this parameter. With variety "Legacy" the maximum number of shoots was achieved with lower plant densities and intermediate culture volumes per flask. In relation to the number of nodes per explant "Brigitta had lower numbers as compared to "Legacy", but with both varieties the number of nodes decreased with smaller volumes of medium in the flasks. For the number of shoots per flask, "Brigitta" responded best at higher densities exceeding 40 shoots per flask. In contrast, "Legacy" produced maximum results at density of 25 explants in 30 mL of medium. It is concluded that for the optimum multiplication of both varieties the correct selection of both, the planting density and the volume of multiplication medium are important.

Keywords: *in vitro* culture, micropropagation, explants, shoots.

* Autor para correspondencia
E-mail: marodrig@uct.cl (M. Rodríguez).

1. Introducción

El cultivo de arándano fue introducido a Chile en la década de los 80 por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) ante la necesidad de diversificar la fruticultura de exportación del país y con el propósito de incorporar a la agricultura intensiva zonas que eran ocupadas con cultivos de baja rentabilidad, desde allí ha mostrado un importante aumento en superficie plantada (Buzeta, 1997). Chile concentra la mayor superficie de cultivo de arándano de Sudamérica y es el segundo productor a nivel mundial, y al año 2013 alcanzó las 14.506 ha con una producción de 136.436 t, las cuales se encuentran distribuidas entre las regiones de Atacama y Los Lagos (Bravo, 2014).

El incremento de las plantaciones ha traído una creciente demanda por plantas, en especial las plantas *in vitro* por su demostrada calidad y homogeneidad (Litwinczuk *et al.*, 2005). La micropropagación en arándano se inició hace aproximadamente 30 años (Cohen y Elliot, 1979; Zimmerman y Broome, 1980) y ha demostrado ser un método eficaz y no generar variabilidad genética si se utiliza organogénesis directa (Gajdošová *et al.*, 2006).

Numerosos estudios han publicado las condiciones del cultivo, medios basales, y reguladores del crecimiento para el óptimo desarrollo *in vitro* de *Vaccinium corymbosum*. Wolfe *et al.* (1983) estudiaron el empleo de distintos medios basales, demostrando que Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd y McCown, 1980) fue el más apto para el crecimiento de brotes de siete medios probados en arándano variedad "Bluecrop", a partir de este estudio, la mayoría de los investigadores han utilizado WPM como medio basal para la micropropagación de arándanos (Wolfe *et al.*, 1986; Reed y Abdelnour, 1991; Isutsa *et al.*, 1994; González *et al.*, 2000). Otros estudios, se han centrado en la búsqueda de las citoquininas adecuadas para el establecimiento y multiplicación *in vitro*, donde destacan, la isopenteniladenina (2iP) y la zeatina (Reed y

Abdelnour, 1991; Debnath y McRae, 2005; Fira *et al.*, 2008). También se ha estudiado el empleo de tidiazurón (TDZ) para inducir brotes adventicios, no obstante, la mayoría de las investigaciones han observado una baja respuesta del arándano respecto a esta hormona (Cao y Hammerschlag, 2000; 2002; Debnath, 2005a; 2005b; Meiners *et al.*, 2007). Otro factor es la concentración de sacarosa, donde se ha reportado la proliferación de brotes en arándano en medios contenidos desde 15 mM (Cao *et al.*, 1998) a 88 mM (Zimmerman y Broome, 1980; Wolfe *et al.*, 1983). Los pH de los medios de cultivo para arándanos son mayoritariamente ácidos, al respecto, Ostrolucká *et al.* (2004) obtuvieron la mejor regeneración en pH 5,0 para la variedad Duke. Otros factores están relacionados a las condiciones ambientales como la irradiación de luz, temperatura del aire, humedad relativa, dióxido de carbono (CO₂), y concentraciones de etileno (Aitken-Christie *et al.*, 1994; Zimmerman, 1995).

No obstante, todas estas investigaciones se basan en el estudio de los factores fisicoquímicos que condicionan el crecimiento y desarrollo del cultivo *in vitro*, pero existe poca información sobre las condiciones físicas como densidad de explantes y volumen de medio en la multiplicación *in vitro* de arándano, la cual es fundamental para la micropropagación comercial razón por la cual se desarrolló la presente investigación en dos de las variedades de arándano alto (*V. corymbosum*) "Brigitta" y "Legacy", más plantadas en Chile. De acuerdo a lo anterior el objetivo de este estudio fue determinar la mejor combinación entre densidad de explantes y volumen de medio que permitan la mayor producción de brotes/frasco en dos variedades de arándano alto.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

Como fuente de explantes se utilizaron plantas *in vitro* de *V. corymbosum*, variedades Brigitta y Legacy, procedentes

de la Universidad Católica de Temuco, Chile, que se encontraban en fase de multiplicación en medio WPM, el explante consistió en trozos de tallos apicales de aproximadamente 1,5 cm.

2.2. Condiciones de cultivo

El medio de cultivo utilizado para ambas variedades fue WPM (Lloyd y McCown, 1980), suplementado con 4 mg L⁻¹ de isopenteniladenina (2iP), 30 g L⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar (Merck) y ajustado a pH 5,2 con KOH (1N) y HCl (1N). La esterilización de medios de cultivo se realizó en una autoclave (Speedy Autoclave HL-340) con las siguientes condiciones: 121 °C con 15 N/m² por 15 min. La siembra se realizó en una cámara de flujo laminar (ESCO AHC-5A1) en frascos de 200 mL y fueron tapados con papel aluminio y sellados con parafilm. Los explantes se incubaron por 45 días a 25 ± 3 °C, con un fotoperíodo de 16 h luz y una intensidad lumínica de 3000 lux.

2.3. Evaluaciones realizadas

Una vez transcurrido 45 días del inicio del experimento se evaluó: altura del brote, número de brotes por explante y número de nudos por brote. Las plantas se midieron con un pie de metro digital. También se calculó el número de brotes totales por frasco multiplicando el número de brotes por explante por la densidad respectiva.

2.4. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar para todos los tratamientos. Se utilizaron cinco combinaciones de densidades de explantes (5, 10, 15, 20, 25 explantes por frasco) por cuatro volúmenes de medio de cultivo (10, 20, 30, 40 mL), totalizando 20 tratamientos. La unidad experimental correspondió a un frasco de 200 mL. Se utilizaron 12 frascos (repeticiones) por tratamiento los que contenían un número variable de explantes y de medio según tratamiento. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS

versión 15 (SPSS, 2006). Se aplicó la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) y se analizó la homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene). Para las diferencias significativas entre promedios ($p \leq 0,05$) se aplicó el test paramétrico (T2 de Tamhane).

3. Resultados y discusión

3.1. Altura del brote

La densidad de explante como el volumen de medio influyeron significativamente ($p \leq 0,05$) sobre la altura del brote, siendo significativa también su interacción, para ambas variedades, no obstante, ante el mismo tratamiento los brotes de Legacy fueron generalmente más largos (Figura 1A y 1B), por ser una variedad más vigorosa.

En la variedad Brigitta, los crecimientos más altos del brote se lograron con densidades y volúmenes de medio elevados (25 explantes por frasco con 30 y 40 mL de medio) superando los 33 mm de altura (Figura 1A), siendo significativamente superior ($p \leq 0,05$) al tratamiento de 20 explantes por frasco con 10 mL de medio donde se obtuvieron los promedios más bajos. Lo anterior puede ser atribuido a la falta de nutrientes por las elevadas densidades de explantes, ya que con el tratamiento con 25 explantes y 10 mL de medio, los resultados fueron similares significativamente. Además, hay que considerar que el volumen del medio y forma del recipiente pueden afectar la composición del gas al interior de éste, y en consecuencia pueden afectar el crecimiento y desarrollo del cultivo (Pereira *et al.*, 2006). Contrariamente a los resultados obtenidos, Mazri (2013) obtuvo disminuciones en la longitud del brote al aumentar la densidad de brotes en el medio. No obstante, las plantas más largas derivadas de las altas densidades no representan necesariamente una ventaja, ya que en algunos casos se observaron etioladas debido probablemente a la competencia por luz, lo cual puede perjudicar su posterior aclimatación. En este sentido, Hamad y Taha (2009)

reportaron que al aumentar el número de brotes del grupo, se reduce la capacidad de formación de brotes por brotes individuales, y aumenta la longitud del tallo. A esto se suma que las plantas *in vitro* por lo general se caracterizan por tener un pobre desarrollo de la capa de cera epicuticular y

de los estomas, ya que éstas no tienen la función normal de transpiración. Debido a la mayor humedad relativa que se encuentra dentro de los frascos, las plantas *in vitro* no tienen la capacidad para resistir el estrés hídrico después del trasplante a las condiciones *ex vitro* (Chen, 2004).

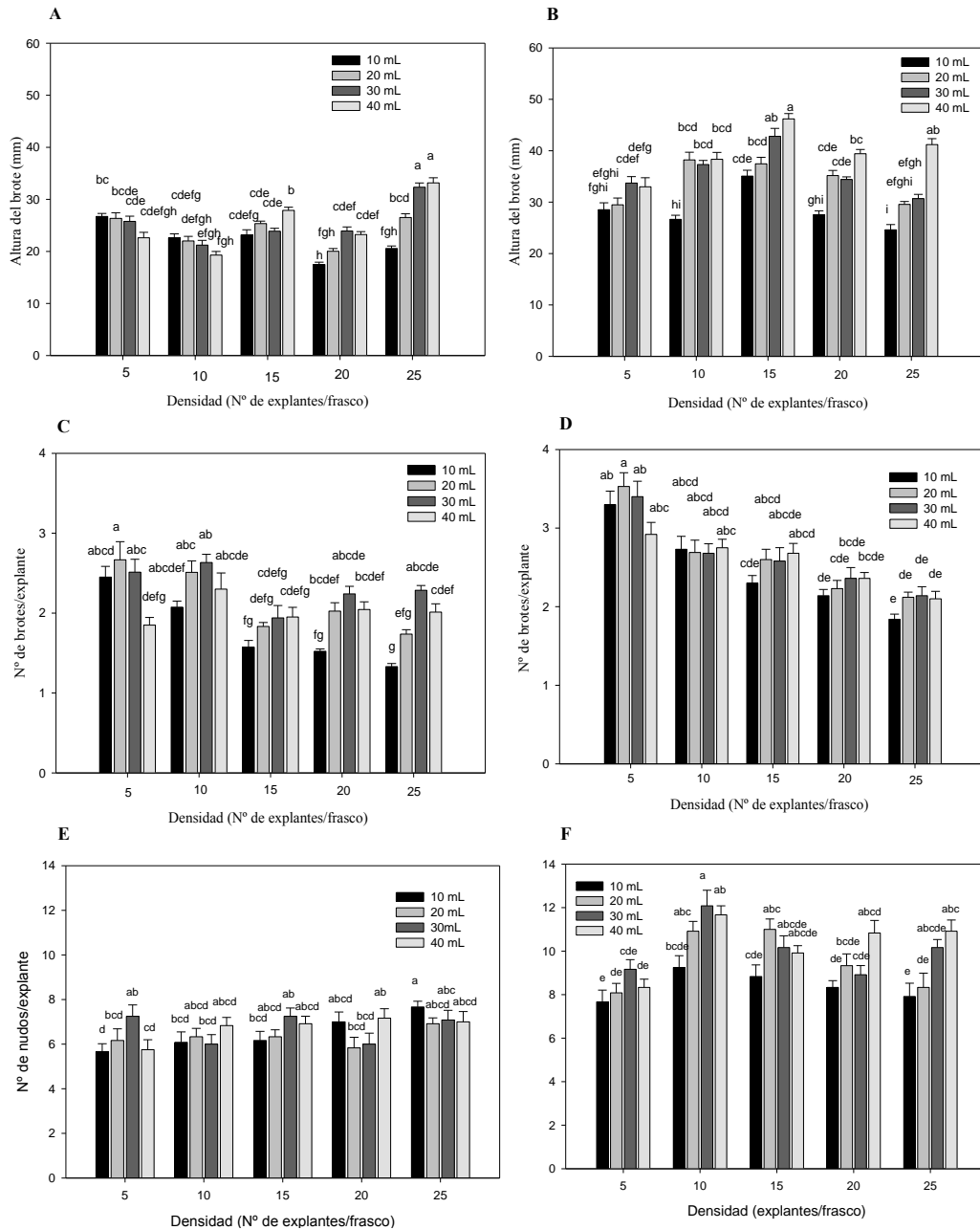


Figura 1. Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo sobre la altura del brote (A, B), número de brotes por explante (C, D) y número de nudos por explante (E, F) en *V. corymbosum* variedad Brigitta (A, C, E) y Legacy (B, D, F). Barras y líneas verticales representan el promedio \pm el error estándar. Letras distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0,05$) dentro de los tratamientos, según test T2 de Tamhane. $n=12$.

En la Figura 1A se aprecia que para el caso de Brigitta no hubo un incremento de la altura del brote con el aumento del volumen de medio para las densidades 5 y 10 explantes por frasco, lo que indica que el volumen no afecta la altura del brote para estas densidades, la baja altura del brote que se obtuvieron en estas densidades se puede explicar por la mayor intensidad de luz que ingresa al frasco a causa de la baja densidad, lo que provoca una mayor temperatura y tensión del medio de cultivo en el interior del frasco, dificultando la absorción de nutrientes en las plantas. Al respecto, Chen (2004) observó que al aumentar la evaporación del medio hubo una disminución de la humedad relativa, induciendo un menor crecimiento del brote, lo que ocurre en las densidades bajas. A partir de la densidad 15 explantes por frasco el volumen de medio de cultivo provocó el aumento del crecimiento del brote, el que obtuvo una respuesta de 27,89 mm de altura en el tratamiento con 15 explantes en 40 mL de medio. Con la densidad de 20 y 25 explantes por frasco ocurrió algo similar a la densidad anterior, donde la altura del brote se fue incrementando al ir aumentando los volúmenes de medio, lo que significa que con altas densidades el efecto del volumen se hace más evidente debido a la competencia que existe entre las plantas por agua y nutrientes, obteniendo la mayor altura del brote en los tratamientos con 25 explantes por frasco en 30 y 40 mL de medio, estas plantas se caracterizaron por ser altas pero con baja proliferación por explante. Kozai *et al.* (1995) informan resultados similares en el cultivo *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum*), quienes señalaron que al ir aumentando los volúmenes de medio el crecimiento del brote se fue acrecentado, agregando además, que la humedad relativa es mayor en densidades elevadas, debido a que se encuentra una mayor cantidad de plantas transpirando induciendo un menor crecimiento del brote. En el caso de la variedad Legacy, la altura del brote (Figura

1B) obtuvo los mayores resultados en la densidad intermedia, presentando diferencias significativas sobre el resto de las densidades, respecto al volumen de medio de cultivo, las plantas más altas fueron aquellas que se encontraban en los tratamientos con volúmenes más elevados. Similar a lo reportado por Reis *et al.* (2007), quienes informaron que con mayores volúmenes de medio se obtienen mayores longitudes de brotes y viceversa, ya que con mayores volúmenes hay mayor disponibilidad de nutrientes para las plántulas, obteniendo además un mayor vigor del brote, una coloración más verde y alta tasa de supervivencia (88%).

La densidad 5 explantes por frasco, fue la única que no presentó diferencias significativas en la altura del brote al aumentar los volúmenes de medio en el caso de Legacy (Figura 1B), lo que indica que a densidades bajas se encuentran satisfechos los requerimientos de disponibilidad de nutrientes y no hay efectos de competencia. En la densidad 10 explantes por frascos en 10 mL de medio (Figura 1B), se obtuvo una baja altura de brote con un promedio de 26,65 mm, mientras que al aumentar los volúmenes a 20, 30 y 40 mL de medio, fue mayor el crecimiento del brote pero entre estos tres no hubo diferencia significativa.

En la densidad de 15 explantes por frasco, se observó algo similar a lo ocurrido en el tratamiento anterior, al incrementar los niveles de medio de cultivo, aumentó la altura del brote, obteniendo en el volumen de 40 mL de medio, dos de los tres mejores resultados a esta variable (Figura 2e), superando los 42 mm de altura del brote (Figura 1B).

En tanto a lo ocurrido en la densidad 20 explantes por frasco disminuyó el promedio de altura del brote en relación a la densidad anterior, esto se puede explicar debido al mayor crecimiento de las plantas en la variedad Legacy, en comparación con la variedad Brigitta, ya que estas últimas no alcanzaron a superar los 34 mm de altura del brote. En este sentido, Assis *et*

al. (2012) señalan que se observan mejores respuestas en volúmenes de medio de 15 y 25 mL de medio MS (50%) en relación a WPM (100 y 50%), por lo que sugieren un volumen de 15 mL para una mayor economía del medio.

En la densidad 25 explantes por frasco se incrementó la altura del brote al aumentar el volumen de medio, demostrando que el volumen influye significativamente en el crecimiento del brote cuando las densidades son elevadas. A esto podemos sumarle que las altas densidades de explantes presentan una mayor humedad relativa en comparación con las densidades más bajas, induciendo un mayor crecimiento del brote.

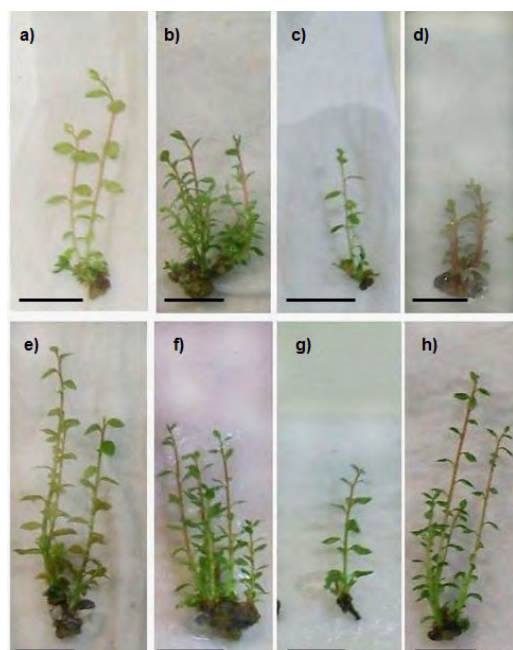


Figura 2. Multiplicación *in vitro* de *V. corymbosum* a los 45 días. Variedad Brigitta (a, b, c, d), 25 explantes en 40 mL de medio (a), 5 explantes en 20 mL de medio (b), 25 explantes en 10 mL de medio (c), 20 explantes en 20 mL de medio (d). Variedad Legacy (e, f, g, h), 15 explantes en 40 mL de medio (e), 5 explantes en 20 mL de medio (f), 25 explantes en 10 mL de medio (g), 25 explantes en 40 mL de medio (h). (Barra = 1 cm).

Orellana (1998) puntualizó la necesidad de valorar experimentalmente la densidad de

explantes por frasco debido a que este parámetro puede ocasionar deficiencias en el sistema; ya que una baja densidad ocasionaría pérdidas de espacio y medio de cultivo, y con ello la subutilización de los recipientes; mientras que una alta densidad propiciaría un crecimiento limitado de los brotes. Mientras que Castro y González (2002) sostuvieron que para lograr un desarrollo en las técnicas de cultivo de tejidos es necesario proveer a las plantas con suficientes cantidades de nutrientes esenciales (incluyendo la sacarosa y carbono como fuentes de energía bajo condiciones heterotróficas), de tal manera que los nutrientes no sean un factor limitante para la multiplicación en el desarrollo de las plantas.

3.2. Número de brotes por explante

El análisis estadístico indicó diferencias significativas para los factores densidad de explantes y volumen de medio así también en la interacción del volumen de medio por la densidad.

En la Figura 1 se observa que para las densidades 5, 10 y 15 explantes por frasco no presentaron diferencia significativa en el número de brotes por explantes en la variedad Brigitta al variar el volumen del medio (Figura 1C), por lo que se puede presumir que los recursos físicos y químicos no fueron limitantes para el desarrollo de estas plantas, alcanzando más de tres brotes por explantes en los tratamientos con cinco explantes por frasco en la variedad Legacy (Figura 1D). En tanto, los tratamientos con 20 y 25 explantes por frasco obtuvieron un resultado inverso, los que no superaron los 2,3 brotes por explante, esto puede explicarse por un mayor sombreado entre plantas y por tanto una mayor dominancia apical. En este sentido, Mazri (2013), reportó algo similar, al obtener el mayor número de brote por trozo cuando la densidad utilizada era de un trozo por frasco (14,7 brotes por explante en medio WPM), sin embargo, teniendo en cuenta el número de brotes regenerados por frasco y

su morfología, se recomiendan más trozos por frasco, ya que el número promedio de brotes regenerados por frasco se podría aumentar, a pesar de que el desarrollo del trozo por frasco en densidades menores es morfológicamente superior, siendo más sanos y uniformes, en comparación a aquellos desarrollados en mayores densidades, los cuales mostraron anomalías morfológicas (hiperhidricidad y pardeamiento). También se ha reportado que una mayor densidad de explantes en el frasco produce una mayor acumulación del gas etileno reduciendo la disponibilidad de oxígeno para la respiración de las plantas, inhibiendo la brotación (Zobayed *et al.*, 2001; Hazarika, 2006). Por otra parte, Williams (1995) sostuvo que los tejidos vegetales (explantes) pueden contribuir a cambios en el medio de cultivo, ya sea por absorción de sustancias desde el medio o exudación al medio, alterando el pH de éste, favoreciendo o inhibiendo el desarrollo de las plantas, debido a que difunden compuestos secundarios en el medio de cultivo a partir de los explantes, que reducen el número de brotes, provocándose además, el agotamiento y competencia por nutrientes (Aicha *et al.*, 2014). A esto se le añade que las altas densidades de explantes provocan un aumento de la humedad relativa al interior del frasco, lo que disminuye la brotación. Shende y Rai (2005) obtuvieron una regeneración de múltiples brotes utilizando una baja humedad relativa en cultivo de *Buchanania lanzan*.

En cuanto a la variedad Legacy análisis de los efectos principales y las interacciones entre éstos, indicaron que existen diferencias significativas. En la densidad 5 y 10 explantes por frasco no presentaron diferencias significativas (Figura 1D) superando los 2,5 brotes por explantes, al respecto Lorenzo *et al.* (1998), estudiaron el efecto del volumen de medio de cultivo por explantes sobre la formación de brotes de caña de azúcar, estos autores señalaron que al aumentar la cantidad de medio de cultivo por explantes se incrementó la

disponibilidad de nutrientes; sin embargo elevadas cantidades de medio de cultivo disminuyeron el número de brotes. No obstante, hay que considerar que el espacio interno disponible para el crecimiento de explantes tiene un efecto significativo sobre el desarrollo *in vitro* de explantes (Assis *et al.*, 2012). Esto se puede explicar debido que en los tratamientos donde se encuentran bajas densidades de explante, la transpiración es menor, lo que conlleva una menor humedad relativa, aumentando la formación de brotes, pero con un menor crecimiento de éste (Chen, 2004).

Por otra parte, en los tratamientos con densidades de 15, 20 y 25 explantes por frasco (Figura 1D), se observa una tendencia aunque no significativa del aumento en el número de brotes por explante al ir incrementando los volúmenes de medio de cultivo, obteniendo resultados que en lo general estuvieron cercanos a los dos brotes por explante, similar a lo reportado por Pereira *et al.* (2006) quienes señalan que a mayor volumen de medio se proporcionan más nutrientes y por lo tanto disminuye la competencia entre las plántulas, lo que explicaría la tendencia para obtener un mayor número de brotes al aumentar el volumen de medio de cultivo. A esto se puede agregar el efecto de competencia entre las plantas, que en densidades elevadas y volúmenes bajos disminuyen la proliferación por explantes, debido al déficit de nutrientes, considerando además, el espacio en el frasco, ya que éste varía con la forma del recipiente y el volumen del medio, pudiendo afectar el volumen de aire dentro del contenedor y la profundidad del medio de crecimiento en éste (Assis *et al.*, 2012). No obstante, existe una clara diferencia significativa entre los tratamientos de 5 explantes/frasco comparativamente con los tratamientos de 25 explantes/frasco, revelando que una baja densidad promueve el número de brotes/explante en la variedad Legacy (Figura 1D),

La baja cantidad de brotes por explantes también se puede explicar porque en altas

densidades se libera una mayor cantidad de toxinas reduciendo el pH, que al contacto con las células de las plantas provoca una conversión de fosfato inorgánico en fosfato orgánico en la región extracelular. Esto también va acompañado de una reducción de ATPs que lleva a la disminución del crecimiento de las plantas y un pobre desarrollo de los brotes (Huda *et al.*, 2009).

3.3. Número de nudos por explante

En la variedad Legacy, el análisis factorial indica efectos significativos del volumen de medio y densidad de explantes (Figura 1F), en tanto que en la variedad Brigitta sólo lo es el factor densidad (Figura 1E). La interacción de factores muestra diferencias significativas para ambas variedades. Brigitta obtiene valores promedios inferiores que Legacy oscilando entre 5,7 y 7,7 vs 7,7 y 12,1 nudos/explante respectivamente. En Brigitta el mayor número de nudos está asociado al tratamiento de 25 explantes / frasco y 10 mL, en cambio el menor valor se obtiene con 5 explantes/frasco y 10 mL

de medio de cultivo (Figura 1E). En Legacy el valor promedio más alto se logra con el tratamiento de 10 explantes por frasco con 30 mL de medio y el menor en los tratamientos de 5 y 25 explantes/frasco con 10 mL de medio (Figura 1F). En general, una menor densidad de medio provoca una disminución del número de nudos/explante en ambas variedades. Sin embargo, el número de brotes por planta es la variable que determina el mayor número de nudos totales y por lo tanto, la mayor tasa de multiplicación en explantes sembrados horizontalmente (Fernández-Lizarazo y Mosquera-Vásquez, 2012).

En la Tabla 1 se muestra el número de brotes totales por frasco y el porcentaje de respuesta entre la densidad de explantes y volúmenes de medio de cultivo, donde los resultados más elevados se pueden observar entre las densidades 15 a 25 explantes en la variedad Brigitta, logrando obtener más de 38 brotes por frasco, con excepción del tratamiento que contenían 15 explantes en 10 mL de medio.

Tabla 1

Efecto de la densidad de explante y el volumen de medio de cultivo sobre el número de brotes por frasco y el porcentaje de respuesta por tratamiento en *V. corymbosum* variedad Brigitta y Legacy a los 45 días

Tratamientos		Brigitta			Legacy		
Nº de explantes frasco ⁻¹	Volumen de medio (mL)	Respuesta de brotación (%)	Nº de brotes frasco ⁻¹		Respuesta de brotación (%)	Nº de brotes frasco ⁻¹	
5	10	100	16,5 ± 0,84	e	100	12,3 ± 0,68	h
5	20	100	17,7 ± 0,87	ed	100	13,3 ± 1,14	h
5	30	100	17,0 ± 0,98	ed	98	12,3 ± 0,81	h
5	40	100	14,6 ± 0,76	e	100	9,3 ± 0,48	h
10	10	96	26,5 ± 1,86	cd	100	20,8 ± 0,75	f
10	20	98	26,5 ± 1,68	c	99	24,9 ± 1,48	ef
10	30	99	26,6 ± 1,28	c	100	26,3 ± 1,03	ef
10	40	99	27,3 ± 1,05	c	100	23,0 ± 2,02	ef
15	10	98	34,1 ± 1,47	bc	98	23,3 ± 1,33	ef
15	20	99	38,8 ± 2,03	ab	100	27,5 ± 0,73	ef
15	30	100	38,7 ± 2,55	abc	97	28,6 ± 2,44	def
15	40	100	40,2 ± 1,86	ab	98	28,9 ± 1,79	def
20	10	97	41,9 ± 1,46	ab	98	30,1 ± 0,67	de
20	20	99	44,3 ± 1,95	ab	100	40,5 ± 2,09	bcd
20	30	100	47,3 ± 2,75	a	99	44,4 ± 1,83	bc
20	40	99	48,5 ± 1,54	a	97	40,0 ± 2,14	cd
25	10	99	45,8 ± 1,63	a	97	32,5 ± 0,97	de
25	20	99	52,9 ± 1,70	a	99	43,2 ± 1,49	bc
25	30	99	53,3 ± 2,88	a	99	56,6 ± 1,53	a
25	40	99	52,3 ± 2,36	a	98	49,7 ± 2,60	b

Letras distintas son diferentes significativamente de acuerdo al test de T2 de Tamanhe ($p \leq 0,05$).

Los promedios más bajos se obtuvieron en tratamiento con densidades de cinco explantes por frasco los que no lograron superar los 18 brotes por frasco. En este sentido, Assis *et al.* (2012) observaron diferencias significativas en los medios de cultivo cuando se contrastaron en diferentes volúmenes de medio, reportando un mayor número de brotes en los volúmenes de 10, 15 y 25 mL de medio MS.

En la variedad Legacy se observa que el tratamiento de 25 explantes en 30 mL de medio logra el mayor número de brotes totales por frasco, alcanzando un promedio de 56,58 brotes por frasco a diferencia de los resultados más bajos que pertenecen a los tratamientos con la densidad de cinco explantes por frasco en todos sus volúmenes de medio, los que no lograron superar los 14 brotes por frasco (Tabla 1). Por lo tanto, cuando se aumenta la densidad de explantes por frascos, el número promedio de brotes regenerados se reduce, y el brote regenerado tiene tallo delgado y hojas pequeñas, observándose además, pardeamiento en los tejidos desde la segunda semana del periodo de cultivo (Aicha *et al.*, 2014).

En cuanto al porcentaje de explantes que formaron brotes fue alto, ya que todos los tratamientos en ambas variedades fueron iguales o superiores al 96% (Tabla 1). Por lo que Hamad y Taha (2009) no sugieren una mayor formación de brotes por explante individual, ya que éste no sería un buen indicador para la producción comercial a gran escala, siendo la producción total de brotes y el costo por brote individual los parámetros más importantes y esenciales.

4. Conclusiones

Respecto a la variable altura del brote, las dos variedades fueron influenciadas tanto por el volumen de medio de cultivo como por la densidad de explantes empleadas. En la variedad Brigitta los brotes más largos se obtuvieron con densidades y volúmenes elevados, en cambio en la variedad Legacy los brotes más largos se

observaron con densidades de 15 explantes por frasco en 30 y 40 mL de medio.

En cuanto al número de brotes por frasco ambas variedades presentan un promedio máximo alrededor de 50 brotes, sin embargo Brigitta alcanza estos promedios con densidades entre 20 y 25 explantes por frasco en todos los volúmenes de medio, en cambio Legacy solo lo consiguió con la densidad de 25 explantes por frasco con altos volúmenes de medio.

Por lo tanto es posible mejorar la producción de brotes con el manejo de la densidad de explantes y volumen de medio lo cual es dependiente de la variedad. En general una alta densidad de explantes asegura una alta producción de brotes por frasco.

5. Referencias bibliográficas

- Aicha, N.; Mohamed, H.; Abdelmalek, E. 2014. *In vitro* clonal propagation through direct shoot organogenesis of thymus broussonetii – a vulnerable aromatic and medicinal plant species. International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Sciences 3(1): 425-439.
- Aitken-Chrisie, J.; Kozai, T.; Smith, M. 1994. Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Assis, K.; Pereira, F.; Rodríguez, J.; Silva, F.; Silva, J.; dos Santos, S. 2012. *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: effects of salt concentration and culture medium volume. Acta Scientiarum. Agronomy 34(1): 77-83.
- Bravo, J. 2014. Boletín frutícola. Avance noviembre 2014. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile. 28 p.
- Buzeta, A. 1997. Chile: berries para el 2000. Departamento Agroindustrial. Fundación Chile. Santiago, Chile.
- Cao, X.; Hammerschlag, F.A. 2000. Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry. HortScience 35: 945-947.
- Cao, X.; Hammerschlag, F.A. 2002. A two-step pretreatment significantly enhances shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry cv. Bluecrop. HortScience 37: 819-821.
- Cao, X.; Liu, Q.; Rowland, L.J.; Hammerschlag, F.A. 1998. GUS expression in blueberry (*Vaccinium* spp.): factors influencing *Agrobacterium*-mediated gene transfer efficiency. Plant Cell Reports 18: 266-270.
- Castro, D.; González, J. 2002. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. Agricultura Técnica 62(1): 68-78.
- Chen, C. 2004. Humidity in plant tissue culture vessels. Biosystems Engineering 88(2): 231-241.
- Cohen, D.; Elliot, D. 1979. Micropropagation methods for blueberries and tamarillos. Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society 29: 177-179.
- Debnath, SC.; McRae, K.B. 2005. A one-step *in vitro* cloning procedure for cranberry (*Vaccinium*

- macrocarpon* Ait.): the influence of cytokinins on shoot proliferation and rooting. *Small Fruits Review* 4: 57-75.
- Debnath, S.C. 2005a. 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: 189-192.
- Debnath, S.C. 2005b. Micropropagation of lingonberry: influence of genotype, explant, orientation, and overcoming TDZ induced inhibition of shoot elongation using zeatin. *HortScience* 40: 185-188.
- Fernández-Lizarazo, J.; Mosquera-Vásquez, T. 2012. Efficient micropropagation of french tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). *Agronomía Colombiana* 30(3): 335-344.
- Fira, A.; Clapa, D.; Badescu, C. 2008. Aspects regarding the *in vitro* propagation of highbush blueberry cultivar blue crop. *Bulletin UASVM, Horticulture* 65(1):104-109.
- Gajdošová, A.; Ostrolucká, M.; Libiaková, G.; Ondrušková, E.; Šimala, D. 2006. Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture *in vitro*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 14: 103-119.
- González, M.; Lopez, M.; Valdes, A.; Ordas, R. 2000. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field grown plants. *Annals Applied Biology* 137: 73-78.
- Hamad, A.M.; Taha, R.M. 2009. Effect of explants density on the *in vitro* proliferation and growth of separated and cluster shoots of smooth cayenne pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Asian Journal of Plant Sciences* 8: 313-317.
- Hazarika, B. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108: 105-120.
- Huda, K.; Bhuiyan, M.; Zeba, N.; Banu, S.; Mahmud, F.; Khatun, A. 2009. Effect of FeSO₄ and pH on shoot regeneration from the cotyledonary explants of Tossa Jute. *Plant Omics Journal* 2(5): 190-196.
- Isutsa, D.; Pritts, M.; Mudge, K. 1994. Rapid propagation of blueberry plants using *ex vitro* rooting and controlled acclimatization of micropropagules. *HortScience* 29: 1124-1126.
- Kozai, T.; Jeong, B.; Kubota, C.H.; Murai, Y. 1995. Effects of volume and initial strength of medium on the growth, photosynthesis and ion uptake of potato (*Solanum tuberosum*) plantlets *in vitro*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 64(1): 63-71.
- Litwinczuk, 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(2): 162-169.
- Lloyd, G.; McCown, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators' Society* 30: 421-427.
- Lorenzo, J.; González, B.; Escalona, M.; Teisson, C.; Espinosa, P.; Borroto, C. 1998. Sugarcane shoots formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 54: 197-200.
- Mazri, M. 2013. Effect of basal medium, explants size and density on the *in vitro* proliferation and growth of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar '16-bis'. *Notulae Scientia Biologicae* 5(3): 332-337.
- Meiners, M.; Schwab, M.; Szankowski, I. 2007. Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 89:169-176.
- Orellana, P. 1998. Propagación vía organogénesis. In: Pérez, J.N. (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. IBP. Santa Clara. pp. 151-176.
- Ostrolucká, M.G.; Libiaková, G.; Ondrušková, E.; Gajdošová, A. 2004. *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis, Biology* 676: 207-212.
- Pereira, F.D.; Pinto, J.E.; Rodríguez, H.C.; Rosado, L.D.; Beijo, L.A.; Lameira, O.A. 2006. Proliferação *in vitro* de brotos de curauá utilizando diferentes volumes de meio. *Plant Cell Culture and Micropropagation* 2(2): 53-106.
- Reed, B.M.; Abdelnour, A. 1991. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *HortScience* 26: 1320-1322.
- Reis, E.S.; Pinto, J.E.; Rosado, L.D.; Correa, R.M. 2007. Tipos de explantes e volumes de meio de cultura no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. *Plant Cell Culture and Micropropagation* 3(2): 83-88.
- Shende, S.; M. Rai. 2005. Multiple shoot formation and plant regeneration of a commercially-useful tropical plant, *Buchanania lanzan* (Spreng). *Plant Biotechnology* 22(1): 59-61.
- SPSS. 2006. SPSS 15.0 Brief Guide. SPSS Inc. USA. 179 p.
- Williams, R. 1995. The chemical microenvironment. In: Aitke, J. (ed.). *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp. 405-439.
- Wolfe, D.E.; Eck, P.; Chee-kok, C. 1983. Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry. *HortScience* 18: 703-705.
- Wolfe, D.; Chin, C.K.; Eck, P. 1986. Relationship of the pH of medium to growth of "Bluecrop" highbush blueberry *in vitro*. *HortScience* 21: 296-298.
- Zimmerman, R.H.; Broome, O.C. 1980. Blueberry micropropagation. In: *Proceedings of the Conference on Nursery Production of Fruit Plants through Tissue Culture* USDA-SEA, Agr. Res. Results ARR-NE. 11: 44-47.
- Zimmerman, R.H. 1995. Environmental effects and their control in plant tissue culture - review. *Acta Horticulturae* 393: 11-14.
- Zobayed, S.; Armstrong, J.; Armstrong, W. 2001. Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. *Annals of Botany* 87: 53-59.